



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**



DRIELLY DAYANNE MONTEIRO DOS SANTOS BALIZA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA *Buchenavia tomentosa* E DOS
SEUS FUNGOS ENDOFÍTICOS E ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA
DA *Eleutherine plicata***

Palmas - TO

2023

DRIELLY DAYANNE MONTEIRO DOS SANTOS BALIZA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA *Buchenavia tomentosa* E DOS
SEUS FUNGOS ENDOFÍTICOS E ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA
DA *Eleutherine plicata***

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Sanzio Pimenta

Co-orientadora: Prof. Dra. Juliana Fonseca Moreira da Silva

**Palmas – TO
FEVEREIRO/ 2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- B186a Baliza, Drielly Dayanne Monteiro dos Santos .
Atividade antimicrobiana da *Buchenavia tomentosa* e dos seus fungos endofíticos e atividade anticancerígena da *Eleutherine plicata*. / Drielly Dayanne Monteiro dos Santos Baliza. – Palmas, TO, 2023.
145 f.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Biodiversidade e Biotecnologia, 2023.
Orientador: Raphael Sanzio Pimenta
Coorientadora : Juliana Fonseca Moreira da Silva
1. Plantas medicinais . 2. Fungos endofíticos . 3. *Buchenavia tomentosa* .
4. *Eleuterina*. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DRIELLY DAYANNE MONTEIRO DOS SANTOS BALIZA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA *Buchenavia tomentosa* E DOS
SEUS FUNGOS ENDOFÍTICOS E ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA
DA *Eleutherine plicata***

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 28/02/2023

Banca examinadora

Prof. Dr. Raphael Sanzio Pimenta (Orientador)
Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda
Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Guilherme Nobre Lima do Nascimento
Universidade Federal do Tocantins

Profa. Dra. Eskálath Morganna Silva Ferreira
Universidade Estadual do Tocantins

Dedico aos meus filhos, Ian e Murilo, minha alegria e força neste mundo. Ao meu amor, Tássio, meu porto seguro. Aos meus pais, minha firme e forte base. À minha irmã, Charllya, que viveu e vive ao meu lado as minhas maiores aventuras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus a oportunidade de trabalhar por alguns anos com algo que tanto amo, que é a microbiologia. Pela maturidade adquirida ao longo dos erros e acertos, as pessoas que cruzaram meu caminho, abrindo portas, emprestando materiais, trocando ideias. Ninguém faz nada sozinho, e no desenvolver dessa Tese, muitas mãos amigas ajudaram.

Agradeço ao meu querido orientador Dr. Raphael Sanzio Pimenta, à quem tenho respeito como a um pai, pela orientação e confiança, pelas oportunidades únicas, pelo impulso, pela recepção sempre bem humorada e os conhecimentos tão gentilmente compartilhados. Agradeço a minha querida co-orientadora, Dra. Juliana Fonseca Moreira da Silva, por seu coração grandioso, a amizade e empatia, lembrando dos meus filhos em meio ao desafio de conciliar as várias jornadas da mulher, por sempre abrir um espacinho em sua agenda tão lotada para uma conversa e direcionamento, sempre tão organizada. Jamais me esquecerei das suas habilidades e satisfação na trabalhosa Biologia Molecular.

Agradeço ao Pedro e Eduardo, os ICs que fizeram acontecer grande parte desse trabalho, em especial ao Pedro, a quem vejo como um grande amigo e grande profissional da medicina. Dedicado e atento, as boas e produtivas conversas sobre a vida, família, trabalho, pesquisa ficarão na memória.

Agradeço a Dra. Eskálath Morganna Silva Ferreira, tão inteligente e acessível, a quem admiro e respeito como uma grande profissional no “mundo Micro”. Obrigada pelos conselhos, dicas, ideias e sugestões, a disposição na Biologia Molecular e explicações tão didáticas. Igualmente, agradeço aos amigos e colegas de turma Flávio, Mayra e Simone, a quem desenvolvi maior proximidade e que tenho um carinho enorme. Agradeço às técnicas Cristiane e Márcia por todo apoio dispensado à mim através dos seus trabalhos dentro do laboratório LAMBIO.

Agradeço ao meu marido, Tássio Baliza, que sempre fez o possível e impossível para que essa tese fosse concluída. Sua dedicação à nossa família é louvável e reconheço que nada disso seria possível sem os seus sacrifícios diários. Obrigada pelos filhos lindos que tivemos ao longo dos últimos quatro anos, que por vezes pareciam tornar as coisas mais difíceis de se realizar, mas na realidade eram e são a força e combustível que eu precisava para prosseguir nesse árduo caminho de doutoramento.

Agradeço à minha irmã, que no mar de incertezas e angústia da ruptura após a primeira licença maternidade, foi um verdadeiro abrigo ao meu primogênito, me acompanhando à universidade quando ainda era muito pequeno, ou ficando com ele para que eu pudesse prosseguir com os trabalhos. Sua vida é preciosa e sua amizade é fundamental na minha vida.

Agradeço aos meus pais, que embora não compreendam com clareza o que todos esses anos culminaram, sempre apoiaram e se orgulharam da minha escolha e trajetória. Obrigada por suas orações, mãe, sei que são elas que nos mantêm em pé. Amo vocês.

Agradeço a parceria da Universidade Federal do Amapá e Universidade Federal do Pará na pessoa do Dr. Irlon Maciel Ferreira e Dr. José Luíz Martins do Nascimento, responsáveis por todo o estudo anticancerígeno envolvido nesta tese, dispondo de seus equipamentos e equipe. Agradeço à Universidade Federal do Tocantins, que me recebeu há mais de 10 anos e proporcionou experiências e aprendizados únicos no campo da graduação, Iniciação Científica, mestrado e doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), à qual agradeço a bolsa de pesquisa.

Por fim, agradeço à todo o grupo de pesquisa do LMGA, que tanto fizeram por mim e meus fungos, pelas risadas, pelos lanches, pela amizade. Sentirei saudades!

“Deus é a minha fortaleza e a minha força, e Ele
perfeitamente desembaraça o meu caminho.”

2 Samuel 22.3

BALIZA, Drielly Dayanne Monteiro dos Santos. **Atividade antimicrobiana da *Buchenavia tomentosa* e dos seus fungos endofíticos e atividade anticancerígena da *Eleutherine plicata***. 2023. 145 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2022.

RESUMO

Os fungos endofíticos vivem em simbiose com a planta hospedeira, sendo que muitos podem apresentar a capacidade de produzir os mesmos metabólitos ativos que seus hospedeiros, tornando-se um reservatório de uma infinidade de produtos naturais antimicrobianos ou anticancerígenos, dentre outros. Esta pesquisa foi dividida em três capítulos. No primeiro capítulo foi utilizada a planta *Buchenavia tomentosa*, ainda pouco estabelecida como medicinal na literatura, para avaliar a capacidade de inibição do crescimento de bactérias patogênicas pelo extrato aquoso da planta e extrato alcoólico dos fungos endofíticos isolados, e avaliar a atividade antagonista destes endofíticos contra o fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*. Das 11 cepas bacterianas testadas, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis* e *Shigella flexneri* apresentaram sensibilidade aos compostos ativos da planta. Obteve-se 22 isolados fúngicos das folhas, e destes, sete apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. typhimurium*, *S. epidermidis* e *S. flexneri*. Dois isolados, FC12 e FC31, apresentaram atividade antimicrobiana contra as três bactérias, e todos os fungos apresentaram inibição de pelo menos uma bactéria testada na concentração de 25 µg/ml (menor concentração observada no teste). Na atividade antagonista, somente o isolado FC123 foi capaz de inibir 53% do crescimento de *R. stolonifer* através da difusão de substâncias, e nenhum resultado foi observado pela produção de compostos voláteis. Os isolados endofíticos testados constituem potenciais fontes de substâncias antimicrobianas, mas novos estudos deverão ser realizados para identificar as espécies endofíticas e as substâncias antimicrobianas por elas produzidas. No capítulo dois foi investigada a atividade anticancerígena da planta *Eleutherina plicata*. Estudos anteriores demonstraram que há três principais substâncias de naftoquinona envolvidos: a eleuterina, isoeleuterina e eleuterol, mas seu mecanismo de ação permanece indefinido. A eleuterina se destaca dentre as demais naftoquinonas e seus mecanismos de ação foram investigados em glioma C6 de rato. A citotoxicidade *in vitro* foi avaliada pelo ensaio MTT; as alterações morfológicas foram avaliadas por microscopia de contraste de fase. A apoptose foi determinada pela anexina A coloração de V-FITC-iodeto de propídio e os efeitos antiproliferativos foram avaliados pela migração da ferida e ensaios de formação de colônias. A expressão da proteína quinase B (AKT/pAKT) foi medida por western blot, e o mRNA da transcriptase reversa da

telomerase foi medido por PCR em tempo real (qRT-PCR). Foi observado que a eleuterina reduziu a proliferação de células C6 de maneira dose-dependente, migração e invasão suprimidas, apoptose induzida e fosforilação reduzida de AKT e expressão da telomerase. Em resumo, os resultados sugerem que a eleuterina tem potencial uso clínico em tratamento de glioma. O capítulo três trata-se de um compilado de técnicas utilizadas para a investigação da produção das substâncias anticancerígenas das plantas pelos fungos endofíticos, sendo parte subsequente do capítulo dois a ser realizada (investigação da produção de eleuterina pelos endofíticos da *E. plicata*). De maneira geral, ambas plantas estudadas são interessantes fontes de produtos biotecnológicos na área de antimicrobianos e anticancerígenos.

Palavras-chave: Antimicrobianos; Anticancerígenos; Mirindiba; Eleuterina.

BALIZA, Drielly Dayanne Monteiro dos Santos. **Antimicrobial activity of *Buchenavia tomentosa* and its endophytic fungi and anticancer activity of *Eleutherine plicata***. 2023. 145 f. Thesis (PhD in Biodiversity and Biotechnology) - Federal University of Tocantins, Palmas, 2022.

ABSTRACT

Endophytic fungi live in symbiosis with the host plant, and many may produce the same active metabolites as their hosts, thereby becoming a reservoir for an infinite number of antimicrobial or anticancer natural products, among others. This study was divided into three chapters. In the first chapter *Buchenavia tomentosa*, a plant not well established as medicinal in the literature, was used to assess the growth inhibition capacity of pathogenic bacteria by the aqueous extract of the plant and alcoholic extract of isolated endophytic bacteria, and evaluate the antagonistic activity of these endophytes against the phytopathogen *Rhizopus stolonifer*. Of the 11 bacterial strains tested, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis* and *Shigella flexneri* were sensitive to the active compounds of the plant. A total of 22 fungal isolates were obtained from leaves, seven of which showed antimicrobial activity against *S. typhimurium*, *S. epidermidis* and *S. flexneri*. Two isolates (FC12 and FC31) displayed antimicrobial activity against three bacteria, and all the fungi inhibited at least one of the bacteria tested at a concentration of 25 µg/ml (lowest concentration obtained in the test). In antagonist activity, only FC123 inhibited 53% of *R. stolonifer* growth by substance diffusion, and no result was observed with the production of volatile compounds. The endophytic isolates tested are potential sources of antimicrobial substances, but new studies should be conducted to identify the endophytic species and microbial substances they produce. Chapter two investigated the anticancer activity of the plant *Eleutherina plicata*. Previous studies demonstrated that there are three main naphthoquinone compounds involved: eleutherine, isoeleutherine and eleutherol, but their mechanism of action remains undefined. Eleutherine stands out among the other naphthoquinones and its mechanisms of action have been investigated in the rat C6 glioma cell line. In vivo cytotoxicity was assessed by the MTT assay, and morphological changes were evaluated by phase-contrast microscopy. Apoptosis was determined by annexin V-FITC/propidium iodide staining and the antiproliferative effects were assessed by wound migration and colony formation assays. Protein kinase B expression B (AKT/pAKT) was measured by western blotting, and mRNA from telomerase reverse transcriptase by real time PCR (qRT-PCR). Eleutherine reduced dose-dependent C6 cell proliferation, suppressed migration and invasion, induced apoptosis and decreased AKT phosphorylation and telomerase

expression. In short, the results suggest that eleutherine has clinical potential in the treatment of glioma. Chapter three discusses a number of techniques used to investigate the production of plant-derived anticancer substances by endophytic fungi, which is a subsequent part of chapter two to be carried out (investigation of eleutherine production by *E. plicata* endophytes). In general, both plants studied are interesting sources of biotechnological products in the area of antimicrobial and anticancer substances.

Keywords: Antimicrobials; Anticancer; Mirindiba; Eleutherine.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1. Objetivo geral	12
1.2. Objetivos específicos	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. Potencialidades biotecnológicas das plantas estudadas	14
2.1.1. <i>Buchenavia tomentosa</i>	14
2.1.2. <i>Eleutherine plicata</i>	15
2.2. Fungos endofíticos e potencialidades biotecnológicas	16
2.3. Tratamento e substâncias bioativas em uso na prática clínica	18
2.4. A multirresistência bacteriana	19
2.5. Câncer	25
Capítulo I - Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à Mirindiba, <i>Buchenavia tomentosa</i> (Combretaceae)	27
Capítulo II - <i>In Vitro</i> Cytotoxic Effects and Mechanisms of Action of Eleutherine Isolated from <i>Eleutherine plicata</i> Bulb in Rat Glioma C6 Cells	40
Capítulo III - Screening of Endophytes for Anticancer Compounds	60
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
4. PERSPECTIVAS FUTURAS	79
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXOS	90

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os micro-organismos endofíticos são cada vez mais reconhecidos como fontes ecologicamente seguras e viáveis no desenvolvimento industrial biotecnológico, na medicina e agricultura (GOUDA et al., 2016; KHAN et al., 2017). Além da influência que exercem em simbiose com a planta hospedeira, é de conhecimento que influenciam a síntese de moléculas bioativas com alto potencial medicinal (SHEN et al., 2019; ANDREOZZI et al., 2019; YADAV, 2018; LATZ et al., 2018).

Nas últimas décadas, diferentes drogas foram sintetizadas a partir de plantas e micro-organismos, incluindo moléculas aplicáveis à atividade anticancerígena e antimicrobiana (GOUDA et al., 2016; CALDERANI et al., 2016). Manganyi e Ateba (2020) identificaram um número significativo dessas substâncias e já foi demonstrada a capacidade de endofíticos sintetizarem metabólitos bioativos semelhantes às plantas hospedeiras (SHARMA e KUMAR, 2021).

O taxol é um fármaco anticancerígeno amplamente utilizado na medicina e foi originalmente isolado da casca da planta *Taxus brevifolia*, sendo produzido também por uma série de fungos endofíticos de diferentes plantas (KASAEI et al., 2017; GILL e VASUNDHARA, 2019). Todos os táxons de fungos endofíticos isolados da planta *Glycyrrhiza glabra* foram capazes de produzir o hormônio promotor de crescimento de plantas ácido indol acético (IAA) (ARORA et al., 2019). Além destes exemplos, destacam-se os fungos produtores da podofilotoxina, principal composto ativo da planta hospedeira *Dysosma versipellis* (TAN et al., 2018).

Dentre os métodos atuais de tratamento do câncer, a quimioterapia é o mais eficaz para o tratamento de tumores metastáticos, porém possui características de multirresistência das células cancerígenas e efeitos colaterais, desencadeando a ineficiência do tratamento (GOTTESMAN e BATES, 2002). Essa resistência pode surgir a partir de alterações em genes regulatórios, decorrentes da exposição ao próprio quimioterápico, tornando-se evidente a necessidade da introdução de novos fármacos para a terapia anticancerígena (WU et al., 2011; GARRAWAY e JANNE, 2012).

O aumento da incidência de câncer e o desenvolvimento acelerado de superbactérias devido à resistência aos antibióticos se apresentam como um dos principais desafios para os pesquisadores nos últimos tempos (KATOCH et al., 2017). Estima-se que a mortalidade por bactérias resistentes será de aproximadamente 10 milhões por ano

em todo o mundo até 2050, superando, inclusive, o câncer como a principal causa de morte (VAN HOUTEN et al., 2018).

Eventos pandêmicos, como os ocasionados pelo novo coronavírus Sars-Cov-2 em 2019, também geram uma busca desordenada e desenfreada por tratamentos e profilaxias, aumentando consideravelmente a utilização de tratamentos que não apresentam efetividade comprovada cientificamente ou possuem indicação farmacológica descrita (MARINHO e PAZ, 2021). A automedicação e o uso excessivo e/ou uso de antibióticos de espectro equivocado contribuem significativamente para o fenômeno da resistência bacteriana, impulsionando novos estudos (FERREIRA et al., 2021).

Sabendo que o uso de endofíticos são a forma mais viável e ecologicamente segura de obtenção de compostos ativos provenientes de plantas, o objetivo desta pesquisa foi investigar as atividades antimicrobiana e anticancerígena das plantas *Buchenavia tomentosa* (Mirindiba) e *Eleutherine plicata* (Marupazinho) e verificar o potencial bioativo de fungos endofíticos à elas associados (RODRIGUEZ e REDMAN, 2008).

1.1. Objetivo geral

Investigar a atividade antimicrobiana da *Buchenavia tomentosa* e dos fungos endofíticos isolados. Verificar a atividade anticancerígena da *Eleutherina plicata* (mecanismos de ação da eleuterina).

1.2. Objetivos específicos

Capítulo I

- Isolar e preservar os micro-organismos endofíticos da *B. tomentosa*;
- Verificar a atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *B. tomentosa* e do extrato fúngico contra os micro-organismos patogênicos *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Shigella flexneri* e *Streptococcus pneumoniae*;

- Verificar a produção de substâncias difusíveis e voláteis dos fungos endofíticos isolados da *B. tomentosa* contra *Rhizopus stolonifer*;

Capítulo II

- Avaliar a atividade anticancerígena da *E. plicata* em modelo experimental de neoplasia cerebral *in vitro*;
- Investigar a atividade anticancerígena da eleuterina obtida de *E. plicata* contra as propriedades proliferativas, migratórias e invasivas, apoptose e mecanismo relacionado da linhagem celular de glioma C6 *in vitro*;

Capítulo III

- Verificar a produção de substâncias anticancerígenas pelos fungos endofíticos da *E. plicata*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Potencialidades biotecnológicas das plantas estudadas

2.1.1. *Buchenavia tomentosa*

A espécie *Buchenavia tomentosa* Eichler é presente no Cerradão (ou Catanduva), floresta semidecídua, mata ciliar, mata de galeria, floresta seca e cerrado, medindo em média 5 a 12 m (LORENZI, 2008). Conhecida popularmente como mirindiba, embridiba, tarumarana ou tonimbuca, essa planta é utilizada na medicina popular na forma de chá para tratamento de tosse, colesterol alto e diabetes (COSTA et al., 2011; SILVA et al., 2010a, RIBEIRO et al., 2017). A madeira proveniente desta espécie é utilizada na construção civil, produção de lenha e carvão, além de apresentar potencial apícola (AZEVEDO et al., 2014).

O crescimento dos frutos ocorre entre junho e setembro, e são caracterizados por polpa carnuda, de sabor doce (maduro), contendo uma única semente (LORENZI, 2008). Além do uso medicinal, os frutos são consumidos na forma de suco ou doces, apesar de relatos de toxicidade aguda causando alterações digestivas e abortos em caprinos, ovinos e bovinos (FERREIRA et al., 2016; MELLO et al., 2010). No entanto, em estudo sobre toxicidade, o extrato aquoso dos frutos não apresentou atividade androgênica ou antiandrogênica, além de não ter apresentado alterações degenerativas e inflamatórias nos animais testados (FERREIRA et al., 2016).

Girondi et al. (2017) comprovaram a atividade antimicrobiana com extratos das folhas (Figura 1) desta planta, observando a inibição do crescimento de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Outras pesquisas demonstraram atividade antifúngica contra *Candida albicans* e redução dos fatores de virulência (TEODORO et al., 2015; TEODORO et al., 2018).

A planta apresenta compostos fenólicos, como ácido elágico e gálico, além de elevado teor de vitamina C (BRIGHENTI et al., 2017). Os extratos metanólicos da casca conferem alta atividade antioxidante a esta planta (TEIXEIRA et al., 2017). Os compostos fenólicos contribuem para a redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas, além de ação anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral (MOJZER et al., 2016; MENA e LLORACH, 2017).



Figura 1 – Folhas de *B. tomentosa* utilizadas nesta pesquisa.

2.1.2. *Eleutherine plicata*

Eleutherine plicata Herb é uma Iridaceae, amplamente utilizada na região amazônica, caracterizada por bulbos avermelhados (purpúreos), formados por camadas de folhas modificadas sobrepostas, denominadas catafilos, folhas plissadas, flores branca ou rosa, e exsudam látex branco quando cortadas (Figura 2) (MALHEIROS et al., 2015). É conhecida popularmente como marupazinho, lírio folha de palmeira, lagrimas de La Virgen (Cuba), marupá-miri, marupai, marupá-piranga, alho do mato, tong-krai-choi (Bangladesh), chikra-choi (Bangladesh), guanyincao (China), nambu-tutano, anajai, coquinho, marupa-ú, marupari, marupa e palmeirinha (RAHMATULLAH et al. 2009; COELHO-FERREIRA, 2009; OLIVEIRA NETO et al. 2007; LEE et al., 2008; COSTA et al. 2010).

Essa espécie é utilizada popularmente para o tratamento da malária, úlceras gástricas, infecção por ameba, infecção parasitária, disenteria, diarreia, distúrbios intestinais, hemorróidas e distúrbios menstruais (RAHMATULLAH et al. 2012; COUTO et al. 2016). Em 2009, foi inserida na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (RENISUS), juntamente com outras 70 espécies de plantas medicinais (BRASIL, 2009).

Dos bulbos de *E. plicata* foram isoladas várias naftoquinonas, naftaleno, antraquinona e compostos de terpenos, sendo os principais constituintes do extrato o eleuterol, eleuterina e isoleuterina (VALE et al., 2020). Essas substâncias compõem os vacúolos celulares na forma de glicosídeos e contém atividade antimicrobiana,

antifúngica, antiviral, propriedades anticancerígenas, antioxidantes e antiparasitárias (DAI et al., 2013).

Pesquisas anteriores demonstraram o efeito antiproliferativo de glioma (U251) e câncer de mama (MCF-7) da eleuterina e isoeleuterina isolados de um extrato metanólico de bulbos de *Cipura paludosa* (CAMPOS et al., 2016). Segundo os resultados, a substância eleuterina é mais citotóxica do que a isoeleuterina. Esses compostos tratam-se de isômeros epiméricos e possuem uma porção 1,4-naftoquinona com apenas uma diferença estrutural, o grupo β -metil da eleuterina e o grupo α -metil da isoeleuterina. Dessa forma, conclui-se que a maior atividade da eleuterina está relacionada à quiralidade de seu anel pirano com o grupo β -metil (CAMPOS et al., 2016).



Figura 2 – Espécimes de *E. plicata* utilizados nesta pesquisa.

2.2. Fungos endofíticos e potencialidades biotecnológicas

Fungos endofíticos são micro-organismos colonizadores de tecidos internos de espécies vegetais como raízes, caule, frutos, folhas e sementes, sem causar efeitos negativos imediatos, podendo trazer vários benefícios para a planta hospedeira como proteção e promoção de crescimento (JIA et al., 2016). A transmissão à planta pode ocorrer de forma horizontal, através de esporos aéreos, ou verticalmente, pelas sementes. Dada a instalação no interior da planta, estes fungos podem permanecer em estado de latência por toda a vida útil da planta, ou por períodos longos enquanto não houver fatores que desfavoreçam a condição de simbiose (ALY et al., 2011).

Acredita-se que os micro-organismos endofíticos incorporam parte do DNA do hospedeiro em seu próprio genoma, possibilitando a adaptação ao microambiente (GERMAINE et al., 2004). Apesar de pouco compreendida, observa-se a transferência de material genético, apresentando em alguns casos uma uniformidade filogenética, sugerindo uma co-evolução (AGOSTINI, 2016; HERRE et al., 1999). Esta co-evolução também é sugerida pela falta de reação de defesa da planta contra a presença de micro-organismos endofíticos (CHRISTENSEN et al., 2002) e pela capacidade de alguns fungos de produzir os mesmos metabólitos ativos que seus hospedeiros (STIERLE et al., 1993).

A relação de simbiose entre o endofítico e o hospedeiro é caracterizada pela proteção e abrigo fornecidos pela planta e a produção de substâncias antibacterianas, herbicidas e fungicidas pelos fungos, fornecendo a defesa necessária contra insetos, pragas e patógenos (CALDERANI et al., 2016). Dessa maneira, os metabólitos secundários fúngicos contribuem significativamente para a descoberta de novos medicamentos, sendo fonte rica de substâncias medicinalmente importantes (GOUDA et al., 2016; SCHUEFFLER et al., 2014; EVIDENTE et al., 2014).

Há vários estudos clínicos envolvendo metabólitos secundários de fungos endofíticos, baseados na atividade seletiva destes micro-organismos contra alvos moleculares relacionados ao câncer (CRAGG e NEWMAN, 2005). Alguns compostos vegetais sintetizados por fungos endofíticos de importância terapêutica são a camptotecina (anticâncer), tricolorina (antifúngico), podofilotoxina (antimitótico) e ácido helvólico (antimicrobiano) (EYBERGER et al., 2006; RAN et al., 2017; YANG et al., 2017; LEYLAIE e ZAFARI, 2018).

Apesar de reconhecidos como importante fonte de produtos bioativos naturais, estima-se que grande quantidade dos compostos procedentes de fungos endofíticos está por identificar (HIGGINBOTHAM et al., 2013). Além disso, o aumento da percepção pública negativa sobre o uso de medicamentos sintéticos, principalmente por preocupações ambientais, impulsiona a comunidade científica a explorar o potencial de produtos naturais como fontes de novas drogas (ALVIN et al., 2014). Dessa forma, pesquisas que visam a bioprospecção de novas substâncias bioativas promovem não somente o conhecimento da diversidade fúngica, como contribui para a obtenção de novos fármacos naturais, com menos impacto à saúde e meio ambiente.

2.3. Tratamento e substâncias bioativas em uso na prática clínica

O tratamento do câncer envolve uma ou várias modalidades e técnicas de tratamento combinadas, sendo a principal a cirurgia oncológica. Esta pode ser empregada em conjunto com radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea, conforme a localização, o tipo do câncer, a condição clínica do paciente e a extensão da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Outras terapias no tratamento do câncer envolvem a hipertermia, uso de lasers, transfusão e doação de sangue, hormonioterapia, terapia alvo, imunoterapia e medicina personalizada (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020; INSTITUTO ONCOLOGIA, 2018).

A cirurgia e radioterapia são considerados tratamentos “locais”, empregados no tratamento de tumores em área específica do corpo. Já os tratamentos medicamentosos como quimioterapia, imunoterapia ou terapia direcionada são chamados de tratamentos "sistêmicos" porque podem afetar o corpo inteiro (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). Essa falta de especificidade afeta as células normais de crescimento rápido (capilares, gastrointestinais e do sistema imunológico), ocasionando efeitos colaterais, como náuseas, perda de cabelo e maior passividade a infecções (INCA, 2019).

Os fármacos anticancerígenos disponíveis possuem diferentes mecanismos de ação, agindo em diferentes etapas do ciclo celular. Há os que atuam diretamente no DNA, por meio de alquilação (transferência de um grupo alquila de uma molécula para outra), os que atuam direta ou indiretamente na síntese de DNA (antimetabólitos), os intercalantes de DNA e os inibidores de mitose e tirosina-quinase (DE ALMEIDA et al., 2005).

Muitos pacientes exibem ou desenvolvem resistência intrínseca ou adquirida aos agentes quimioterápicos anticancerígenos, sendo a maioria destes agentes altamente tóxicos, principalmente em células de rápida divisão celular (GARRAWAY e JANNE, 2012; ROCHE, 2013). De forma geral, células tumorais podem adquirir resistência a partir de alterações em genes regulatórios, resultante da exposição ao próprio quimioterápico (WU et al., 2011; GARRAWAY e JANNE, 2012).

Em torno de 60% das substâncias utilizadas na terapia anticancerígena são provenientes de fontes naturais, sendo o reino vegetal a maior fonte dessas substâncias naturais (BHANOT et al., 2011; COSTA-LOTUFO et al., 2010). As principais classes de compostos já testadas são os terpenos (sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos),

alcalóides, cumarinas, lignanas, flavonóides, taninos, stilbenos, curcuminóides e polissacarídeos (CAI et al., 2004).

O paclitaxel, de nome comercial Taxol, é um flavonóide extraído da casca do teixo (*Taxus brevifolia*) e um dos medicamentos anticancerígenos mais bem-sucedidos utilizados nos últimos anos (CROTEAU et al., 2006). Os alcalóides vinblastina e vincristina, encontrados principalmente nas folhas de *Catharanthus roseus*, são outros exemplos de compostos naturais com atividade anticancerígena, e são comercializados sob os nomes Velban e Oncovin ou Vincovin (SHARMA et al., 2016). A partir da podofilotoxina (lignana ariltetralínica isolada da *Podophyllum peltatum* e *Podophyllum emodii*), também obteve-se o etoposídeo e o teniposídeo, utilizados no retardamento de tumores mediante inibição da enzima topoisomerase II ou DNA-girase (BRANDÃO et al., 2010).

Algumas linhagens tumorais já não respondem à farmacoterapia disponível e muitos tratamentos são ineficientes, impulsionando a pesquisa de novos fármacos anticancerígenos (AVENDAÑO e MENÉNDEZ, 2008). Nesse sentido, pesquisas avançam na identificação de compostos bioativos com atividade anticancerígena, como o lupeol (terpeno supressor de células cancerígenas da cabeça e pescoço), isolado de folhas de *Hedera nepalensis* (JAFRI et al., 2015); diarthronchas A - D e daphnauranol B (sesquiterpenóides) isolados das raízes de *Diarthron tianschanica* (SUN et al., 2018); L-asparaginase (indutora de apoptose em células tumorais), encontrada em vários tecidos vegetais e microbianos (ABDELRAZEK et al., 2020), entre outros.

2.4. A multirresistência bacteriana

Os antimicrobianos são produtos do metabolismo microbiano capazes de inibir parcial ou totalmente o crescimento e multiplicação de micro-organismos, e podem ser classificados como antibióticos (substâncias químicas produzidas por micro-organismos) ou quimioterápicos (substâncias sintetizadas ou produtos microbianos modificados estruturalmente em laboratório) (NAKANO et al., 2022).

O uso destas substâncias foi revolucionário no campo da prevenção e tratamento de processos infecciosos, no entanto, a prescrição nem sempre criteriosa ou racional desses antimicrobianos promoveu uma progressiva resistência bacteriana, tornando-se

uma ameaça crescente e um desafio global (MONTELLI e SADATSUNE, 2001; HU et al., 2019).

A penicilina foi o primeiro fármaco antimicrobiano aplicado ao tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. Descoberta em 1928 pelo médico escocês Alexander Fleming, contribuiu drasticamente no controle de infecções e doenças bacterianas, no entanto, os efeitos e mecanismos de ação desse fármaco só foram compreendidos posteriormente (NAKANO et al., 2022; GARCIA e COMARELLA, 2021).

Em menos de um ano de uso da penicilina, foi relatado um gene plasmidial que codifica a enzima β -lactamase, destruindo o anel β -lactâmico e inativando suas moléculas (KONEMAN et al., 2018). Porém, a detecção de β -lactamases em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas remonta-se aos inícios dos anos 40, antes mesmo do uso generalizado da penicilina no mundo (ABRAAM e CHAIN, 1940; KIRBY, 1944).

A resistência antimicrobiana é caracterizada pela capacidade da bactéria evadir os mecanismos de ação de compostos antimicrobianos, mantendo-se viável, após serem expostas à eles (CHRISTAKI et al., 2020). A resistência surge naturalmente, como uma resposta evolutiva da exposição bacteriana à estes agentes antimicrobianos (MEDINA et al., 2020). Os principais mecanismos de ação envolvem os mecanismos farmacodinâmicos de produção de enzimas que destroem ou modificam a ação dos antibióticos; redução da permeabilidade da membrana externa; sistemas de efluxo hiperexpressos (excreção de substâncias tóxicas); alteração, bloqueio ou proteção do sítio alvo do antibiótico; e formação de biofilme (FARIA et al., 2021). Na Figura 3 encontram-se os mecanismos de ação envolvidos nas principais classes de antimicrobianos.

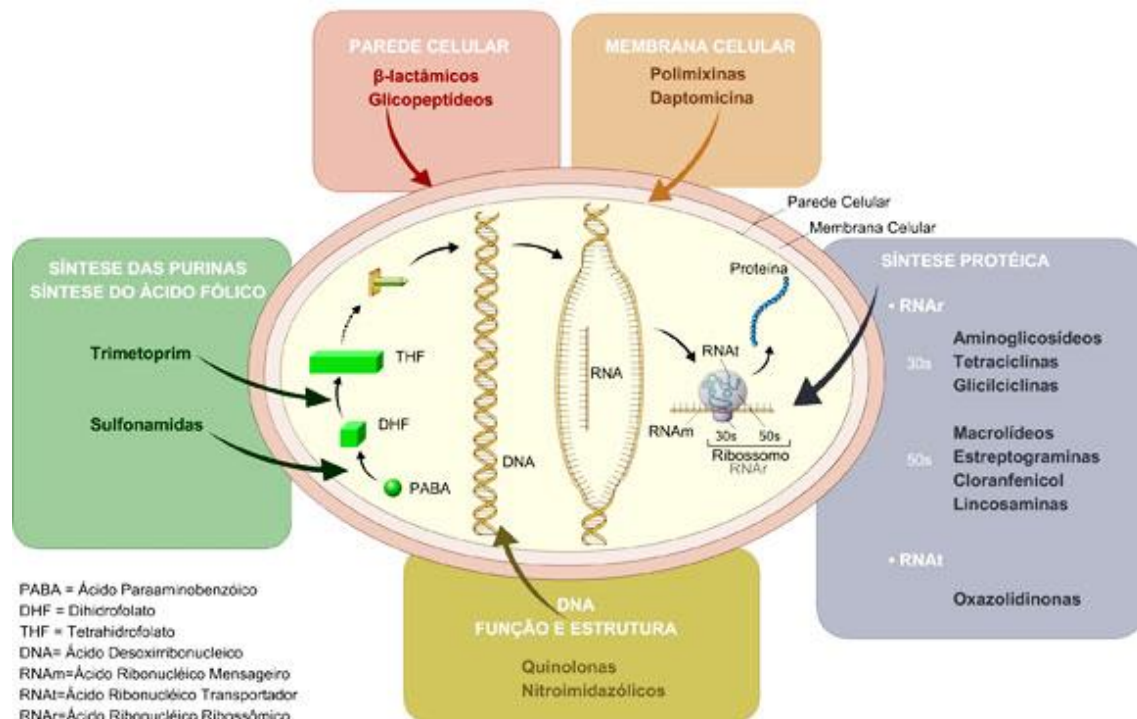


Figura 3 – Os principais alvos de ação de antimicrobianos.

(Fonte: <https://farmaceuticodigital.com/2018/06/como-os-antimicrobianos-sao-classificados.html>)

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde publicou a primeira lista de agentes patogênicos prioritários resistentes aos antibióticos com 12 famílias de bactérias que representam a maior ameaça para a saúde humana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). A lista classificou a necessidade de novos antibióticos em prioridade crítica, alta ou média (Quadro 1). Observa-se que o grupo em nível crítico é predominantemente de β-lactâmicos, seguido das Quinolonas, Glicopeptídeos e Macrolídeos/cetolídeos.

Quadro 1 - Lista de agentes patogênicos prioritários da WHO para a produção e desenvolvimento de novos antibióticos.

Prioridade	Micro-organismo	Resistência	Classificação
CRÍTICA	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenema	β -lactâmicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenema	β -lactâmicos
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Carbapenema, produtoras de ESBL*	β -lactâmicos
ALTA	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina	Glicopeptídeos
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina (sensibilidade intermediária) Vancomicina	β -lactâmicos Glicopeptídeos
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina	Macrolídeos/cetolídeos
	<i>Campylobacter</i> spp.	Fluoroquinolonas	Quinolonas
	<i>Salmonellae</i>	Fluoroquinolonas	Quinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporina Fluoroquinolonas	β -lactâmicos Quinolonas
MÉDIA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina	β -lactâmicos
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina	β -lactâmicos
	<i>Shigella</i> spp.	Fluoroquinolonas	Quinolonas

*ESBL - β -lactâmicos de espectro estendido.

Nos β -lactâmicos a atividade bactericida ocorre através da inibição da parede celular bacteriana e é conferida pelo anel β -lactâmico de seu núcleo estrutural. A característica da cadeia lateral define o seu espectro e propriedades farmacológicas. Pertencem à esse grupo as penicilinas, cefalosporinas, carbapenens e monobactams (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007). As alterações químicas em cada grupo modificam as características de afinidade por receptores dos antibióticos, espectro de ação, e diferentes formas de resistência desenvolvidas pelas bactérias. Na figura 4 pode ser observada a estrutura química de cada classe da subfamília dos β -lactâmicos (ARRUDA et al., 2019).

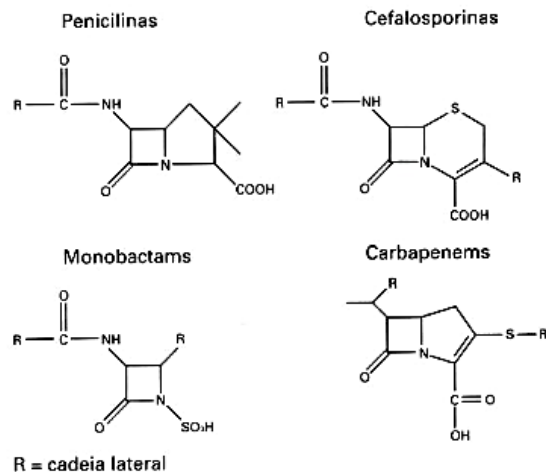


Figura 4 - Estrutura dos antibióticos β -lactâmicos (WILLIAMS, 1999).

As quinolonas são antimicrobianos de espectro estendido usados no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas (DROLET, 2018). O ácido nalidíxico foi o membro inicial da classe, identificado como subproduto da síntese da cloroquina em 1962, com uso clínico limitado para o tratamento de infecções do trato urinário e pelo surgimento precoce de resistência (LESHER et al., 1962). Modificações químicas do núcleo quinolona foram realizadas acrescentando um átomo de flúor na posição 6 do anel quinolônico, criando as fluorquinolonas, aumentando o espectro antimicrobiano, melhorando a farmacocinética e menor frequência de desenvolvimento de resistência (Figura 5) (DOMAGALA e HAGEN, 2003).

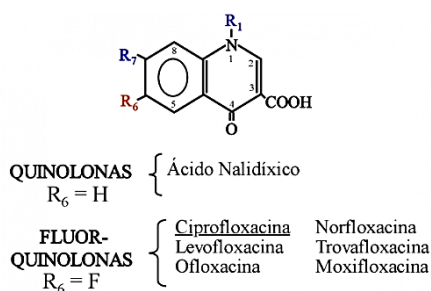


Figura 5 - Modificações químicas do núcleo quinolona acrescentando um átomo de flúor na posição 6 do anel quinolônico. (Fonte: <https://farmaceuticodigital.com/2018/06/como-os-antimicrobianos-sao-classificados.html>).

O mecanismo de resistência às quinolonas mais frequente envolve mutações cromossômicas em regiões conhecidas como determinantes de resistência às quinolonas (QRDR, sigla do inglês *quinolone resistance determining region*) representadas pelas enzimas DNA girase e topoisomerase IV, compostas por duas unidades promotoras, *gyrA* e *gyrB*, e *parC* e *parE*, respectivamente (ALDRED et al., 2013; DROLET et al., 2018).

Os glicopeptídeos inibem a síntese do peptidoglicano da parede celular, em função da sua ligação com resíduos L-aa-aa-D-D-aa presentes somente na parede celular de bactérias, conferindo a sua seletividade (Figura 6). Também estabelecem pontes de hidrogênio com os peptideoglicanos formando complexos estáveis que inibem a formação das cadeias de glicano devido o impedimento estérico para a peptidoglicano polimerase e, conseqüentemente, a transpeptidação que dá rigidez à parede celular (LIMA, 2013).

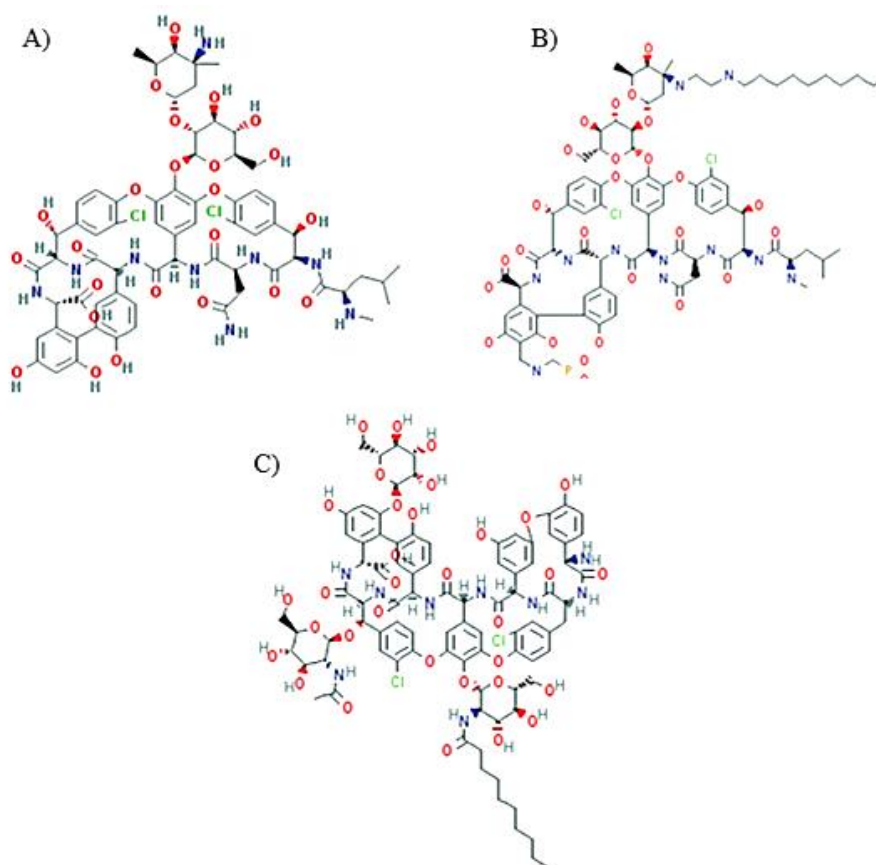


Figura 6 - Estrutura química dos fármacos glicopeptídeos (A) vancomicina hidrocloreto, (B) telavancina e (C) teicoplanina (LIMA, 2013).

Os macrolídeos são caracterizados pela estrutura lactona macrocíclica a qual estão ligados um ou mais açúcares desoxi. São agentes bacteriostáticos, que inibem a síntese

de proteínas através de sua ligação às subunidades ribossômicas 50S, particularmente na molécula 23S do RNA, impedindo as reações de transpeptidação e translocação (ANVISA, 2007).

Para que a eficácia dos agentes antimicrobianos seja mantida a longo prazo, é necessário monitoramento da suscetibilidade antimicrobiana, atrelada à escolha antibioticoterapia adequada, tanto em medicina humana quanto em veterinária (MOYAERT et al., 2019). Ademais, o número de novos antimicrobianos desenvolvidos nos últimos anos foi muito limitado, levando a uma diminuição considerável das opções terapêuticas para o tratamento de infecções mais graves, evidenciando a importância de estudos no âmbito de novos compostos ativos contra bactérias (ALVARADO et al., 2020).

2.5. Câncer

O câncer, também conhecido por neoplasia, é uma doença ocasionada pelo crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos de forma agressiva e incontrolável, formando os tumores que podem se espalhar por outros locais do corpo (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA, 2019).

Os vários tipos de células do corpo definem os diferentes tipos de câncer, que de acordo com a Classificação Internacional de Doenças (CID-10, versão 2010) podem ser: lábio, cavidade oral e faringe; esôfago; estômago; colorretal (incluindo ânus); fígado; vesícula biliar (incluindo extra-hepática ducto biliar e ampola de Vater); pâncreas; laringe; pulmão (incluindo traquéia); melanoma da pele; mama feminina; colo uterino; corpo uterino; ovário; próstata; rim (incluindo pelve renal); bexiga; cérebro e sistema nervoso central; tireóide; linfoma de Hodgkin; linfoma não-Hodgkin; mieloma múltiplo (incluindo doenças imunoproliferativas; leucemia e todos os cânceres combinados, excluindo o câncer de pele não melanoma (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Existem categorias mais abrangentes para o câncer, que se distinguem de acordo com o local em que se originaram, como os carcinomas (pele), sarcomas (ossos), leucemias (tecido produtor de sangue), linfomas e mielomas (células do sistema imunológico), e cânceres do sistema nervoso central (cérebro e medula espinhal) (INSTITUTO ONCOLOGIA, 2017). Outra classificação é conhecida como metástase, que se refere a velocidade de multiplicação das células e capacidade em invadir tecidos e

órgãos próximos ou distantes, como por exemplo, um câncer de próstata que se disseminou para os ossos, será definido como câncer de próstata metastático, e não tumor ósseo (INCA, 2019; INSTITUTO ONCOGUIA, 2017).

A doença pode ser causada por fatores internos (inerente ao indivíduo) como ação hormonal, condição imunológica e mutações genéticas, e por fatores externos, como vírus, substâncias químicas e radiação (PETIT et al., 2013; INCA 2019). Estes fatores podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover o processo de formação do câncer, podendo levar anos entre mutações e/ou exposições a fatores de risco e o diagnóstico/deteção da doença (INCA, 2019).

Considerado uma das quatro causas principais de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países, o câncer tem como fatores de incidência e mortalidade o envelhecimento, o crescimento populacional e a mudança na distribuição e prevalência dos fatores de risco, especialmente os associados ao desenvolvimento socioeconômico (INCA, 2019). Nos países em desenvolvimento, observa-se um declínio dos tipos de câncer associados a infecções e o aumento dos associados a condições socioeconômicas (sedentarismo, alimentação inadequada, entre outros) (BRAY et al., 2018).

A estimativa mundial mais recente (ano 2018), revela que no mundo ocorreram mais de 18 milhões de casos novos de câncer e que em 2040 esse número poderá atingir 29 milhões (aumento de 63%). O câncer de pulmão é o mais incidente no mundo (2,1 milhões) seguido pelo câncer de mama (2,1 milhões), cólon e reto (1,8 milhão) e próstata (1,3 milhão) (BRAY et al., 2018). De 2023 a 2025, o Brasil terá cerca de 704 mil novos casos de cânceres a cada ano, resultando em mais de 2 milhões de novos diagnósticos da doença no próximo triênio (INSTITUTO ONCOGUIA, 2022).

**Capítulo I - Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos
associados à Mirindiba, *Buchenavia tomentosa* (Combretaceae)**

(Publicado na Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins –
A4 em Biotecnologia)

INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade as plantas despertam interesse como fontes viáveis e promissoras de frações terapêuticas (RAO e HARIPRASAD, 2021). É de conhecimento que o início do seu uso ou de seus extratos foi instintivo, através da manipulação pelas pessoas em seu meio ambiente para curar doenças ou desconfortos (ALAMGIR, 2017). No entanto, muitas plantas ainda são desconhecidas ou seu uso medicinal não está estabelecido, como as plantas do gênero *Buchenavia* (LOPES e MARUO, 2015).

Com o aumento alarmante da resistência microbiana aos medicamentos convencionais em todo o mundo, o uso de novas fontes de substâncias antimicrobianas como alternativa aos medicamentos convencionais tem aumentado (AYUKEKBONG et al., 2017; VASAN et al., 2019; MANGANYI e ATEBA, 2020). Além disso, o desenvolvimento da resistência microbiana contra agentes quimioterápicos, como os antibióticos, torna essencial e urgente o rastreamento de novas terapêuticas eficazes, seguras, baratas e disponíveis para a população (ATEF et al., 2019).

A microbiota fúngica endofítica possui alta capacidade metabólica e pode estar relacionada com a produção de uma infinidade de metabólitos secundários que podem ser explorados, como antimicrobianos, anti-inflamatórios, agentes antitumorais, antioxidantes e mesmo como promotores de crescimento vegetal. O uso de fungos endofíticos ao invés de plantas é muito interessante, pois reduz o tempo, custo e área de produção e são, desta forma, uma alternativa ecologicamente sustentável e economicamente viável de obtenção destas substâncias (RODRIGUEZ e REDMAN, 2008).

As características químicas e os metabólitos secundários produzidos pelas plantas do gênero *Buchenavia* têm sido associados a atividades biológicas importantes, como antibacteriana, antifúngica e anti-HIV (LOPES e MARUO, 2015; TEODORO et al., 2015; CAVALCANTI et al., 2017; BEUTLER et al., 1992). As propriedades antimicrobianas de extratos de *Buchenavia tomentosa* já foram observadas anteriormente, mas a comunidade fúngica endofítica ainda não foi examinada quanto ao seu potencial bioativo (BRIGHENTI et al., 2014; TEODORO et al., 2015). Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a produção de substâncias antimicrobianas produzidas por fungos endofíticos associados à *Mirindiba* (*B. tomentosa*).

METODOLOGIA

Coleta do espécime vegetal *Buchenavia tomentosa* Eichler

O material vegetal foi coletado de 5 árvores, situadas no Centro de Pesquisa Canguçu, no município de Pium, sudoeste do Estado do Tocantins, às margens da Ilha do Bananal, sob as coordenadas S 9° 58' 40" W 50° 02' 01.2"; S 9° 58' 40.3" W 50° 02' 00.9"; S 9° 58' 44.4" W 50° 02' 13.7"; S 9° 58' 46.7" W 50° 02' 09.3" e S 9° 58' 48.2" W 50° 02' 16.4". A exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual do Tocantins sob o código 8215.

Elaboração do extrato de *B. tomentosa* e avaliação da atividade bacteriana

O extrato aquoso de *B. tomentosa* foi obtido a partir da trituração de 12 folhas de tamanho médio em 500 ml de água mineral estéril. Em seguida a solução obtida foi acrescida de mais 500 ml de água mineral e, então, submetida a decocção por 2 min., totalizando 1L de extrato (chá).

O extrato foi avaliado contra os patógenos *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (NEWP 0083), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (NEWP 0128), *Shigella flexneri* (ATCC 12022) e *Streptococcus pneumoniae*, obtidos da coleção de culturas Carlos Rosa do Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada da Universidade Federal do Tocantins. Os micro-organismos estavam armazenados a -80 °C em caldo Brain Heart Infusion (BHI) com 20% de glicerol. Para reativação foram repicados em caldo Mueller Hinton e incubados por 24 h a 36 °C em estufa bacteriológica. Posteriormente, foram repicados para tubos de ensaio contendo ágar Nutriente inclinado e incubadas por 24 h a 36°C, e armazenadas em geladeira a temperatura de 4 °C até o momento de preparo para os testes.

Os ensaios foram realizados de acordo com a técnica de micro diluição em caldo, em placas de 96 poços. Em cada cavidade da microplaca foram adicionados 100 µL de caldo Muller Hinton (CMH), 5 µL de suspensão de bactérias contendo 10⁷ UFC/mL e 100 µL do extrato aquoso. Como controle positivo foi utilizado 100 µL CMH, 5 µL de

suspensão de bactérias contendo 10^7 UFC/mL e 2 mg/mL de cloranfenicol e a suspensão de bacteriana. O controle negativo foi realizado com a inoculação de CMH, solvente DMSO 10% e inóculo. Para controle de crescimento foi utilizada 5 μ L de suspensão de bactérias 10^7 UFC/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h (OLIVEIRA et al., 2016). Posteriormente, 30 μ L de resazurina a 0,03% (m/v) estéril foi adicionada em cada cavidade para verificação do crescimento microbiano, sendo que a visualização de cor azul indicava de ausência de crescimento e cor rosa crescimento microbiano (PALOMINO et al., 2002 - modificado). O experimento foi qualitativo, realizado em triplicata.

Isolamento dos fungos endofíticos

Foram selecionadas 15 folhas de 5 árvores (3 folhas por árvore) para o isolamento dos fungos endofíticos. As folhas foram submetidas ao processo de desinfecção superficial para a eliminação de micro-organismos epifíticos, por meio de lavagens seriadas em etanol a 70% (v/v) (1 min.), hipoclorito de sódio 2 % (3 min.) e H₂O mQ estéril (2 min.). Após a desinfecção, três fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² de cada material vegetal coletado foram transferidos para placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) suplementadas com 100 μ g/mL de cloranfenicol.

As placas foram incubadas a 25 °C por até 20 dias. Os isolados foram transferidos para novas placas de Petri contendo BDA para purificação. Os micélios obtidos foram preservados em frascos estéreis contendo água destilada estéril, em duplicata e temperatura ambiente (CASTELLANI, 1967).

Preparação dos extratos fúngicos e avaliação da atividade antimicrobiana (concentração inibitória mínima – CIM)

Os fungos endofíticos foram reativados inoculando um disco de ágar BDA contendo o micélio de cada amostra em nova placa contendo BDA e incubando à 25 °C por 5 dias. Após esse período, foi realizada a fragmentação do micélio fúngico juntamente com o meio de cultivo, utilizando como líquido extrator o álcool etílico absoluto. Após 10 dias os macerados foram filtrados e os extratos brutos submetidos à remoção do solvente com auxílio de evaporador rotativo.

Os extratos obtidos foram solubilizados em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% e homogeneizados até completa dissolução (OLIVEIRA et al., 2016 - modificado). Os testes de concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados pela metodologia padronizada de microdiluição em caldo, em microplacas de 96 poços tipo Elisa, em triplicata (OLIVEIRA et al., 2016a). Em cada cavidade da microplaca foram adicionados 100 µL de caldo Muller Hinton (CMH). Em seguida adicionaram-se os extratos realizando diluição seriada. Foram realizadas 8 diluições de cada amostra obtendo-se concentrações finais de extrato de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,6; 0,78 mg/mL. Foram avaliadas como alvo de inibição as seguintes espécies de bactérias: *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis* e *Shigella flexneri*, nas concentrações de 10^7 UFC/mL. Como controle positivo foi utilizado CMH, 2 mg/mL de cloranfenicol e as culturas bacterianas, como controle negativo foi utilizado CMH, solvente DMSO 10% e inóculo bacteriano. Para controle de crescimento foi utilizada 5 µL de suspensão de bactérias 10^7 UFC/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h (OLIVEIRA et al., 2016).

Posteriormente, em cada cavidade da microplaca foi adicionada 30 µL de resazurina a 0,03% (m/v) estéril para verificação visual do crescimento microbiano, sendo a presença de cor azul representativa de ausência de crescimento e cor rosa, presença de crescimento microbiano (PALOMINO et al., 2002 - modificado). Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiano.

Avaliação da atividade antifúngica dos extratos aquosos dos fungos endofíticos de *B. tomentosa*

Os fungos endofíticos isolados foram testados pelo método da cultura pareada quanto à produção de substâncias difusíveis e voláteis frente ao fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*. Os isolados endofíticos foram previamente cultivados em BDA por 5 dias. Em seguida, um disco de ágar de 0,5 cm de diâmetro contendo micélio de cada fungo endofítico foi inoculado em um lado de uma placa de Petri contendo BDA e incubado por 3 dias a 25 °C. Posteriormente, um disco similar contendo uma cultura do fitopatógeno foi inoculado na outra extremidade da placa (4 cm de distância). O diâmetro da colônia do patógeno foi estimado após incubação por dois dias a 25 °C, com auxílio de um paquímetro digital (Starret® 799), e comparado com o diâmetro observado na cultura controle (PINTO et al., 2011).

Para a verificação da produção de substâncias voláteis foram utilizadas placas de Petri com uma divisória a fim de evitar o efeito da difusão. As placas foram seladas com parafilme para evitar possível dissipação das substâncias presentes. O padrão de crescimento do fitopatógeno (cultura controle) foi obtido por meio da inoculação de um disco de ágar de 0,5 cm de diâmetro contendo micélio do fitopatógeno sozinho em Placas de Petri contendo BDA. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 encontram-se os resultados da atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *B. tomentosa*. Três, das 11 cepas bacterianas testadas, apresentaram sensibilidade aos compostos ativos da planta (*Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis* e *Shigella flexneri*), demonstrando um possível potencial de utilização desta espécie vegetal para obtenção de substâncias antibacterianas contra patógenos resistentes a antimicrobianos comerciais utilizados na atualidade. Estudos anteriores demonstraram que extratos de *B. tomentosa* obtidos por outros métodos exerceram inibição sobre *S. aureus* (acetato de etila), *E. faecalis* (fração hexânica) e *P. aeruginosa* (extrato etanólico) (BATISTA et al., 2011; GIRONDI et al., 2017).

Tabela 1 – Atividade antibacteriana do extrato aquoso da Mirindiba (*Buchenavia tomentos*) contra cepas de: *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pneumoniae*.

Patógenos	Inibição
<i>Bacillus cereus</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-

<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+
<i>Shigella flexneri</i>	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-

+ inibição do crescimento, - ausência de inibição do crescimento.

Esse resultado contrastante possivelmente ocorreu pela diferença de polaridade dos compostos extraídos por cada método. Enquanto a ação inibitória dos extratos aquosos envolve as substâncias hidrofílicas (aminoácidos, açúcares, alcaloides na forma de sal, saponinas, heterosídeos, flavanóides e as mucilagens), os extratos alcoólicos e hexânicos fornecem uma extração mais ampla, incluindo compostos menos polares, e consequentemente mais propriedades antifúngicas e antimicrobianas (SIMÕES, 2001). No entanto, o extrato aquoso é um método mais simples, mais próximo do uso pelas comunidades tradicionais e da população de um modo geral.

As plantas da família Combretaceae têm sido utilizadas como medicinais em todo o mundo, especialmente na Ásia e África (FYHRQUIST et al., 2002). Dentre os 20 gêneros pertencentes à esta família, o gênero *Buchenavia* apresenta atividades biológicas promissoras, como os observados por OLIVEIRA et al.(2012): ampla atividade antimicrobiana (inibição de crescimento de *Micrococcus luteus* (CIM: 0,10 mg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (CIM: 0,20 mg/mL), *Mycobacterium smegmatis* (CIM: 0,39 mg/mL), *Proteus vulgaris* e *Staphylococcus aureus* (CIM: 0,78 mg /mL para ambos)), além da presença de flavonóides, triterpeno, carboidrato e tanino.

Os frutos de *B. tomentosa* foram relatados como tóxicos para ovinos, caprinos e bovinos, mas um estudo fitoquímico realizado por Batista (2011) identificou 7 substâncias de caráter antimicrobiano e antiradicalar (radicais livres) em *B. tomentosa*, sendo eles os ácidos fenólicos galato etila (1) e galato de metila (2), ácido gálico (3), os taninos hidrolisáveis corilagina (4) e buchenavina (5), e as lignanas pinoresinol (6) e o epipinoresinol (7) (MELO et al., 2010).

Sabendo-se da capacidade de endofíticos sintetizarem metabólitos bioativos semelhantes às plantas hospedeiras (SHARMA e KUMAR, 2021), o isolamento realizado nesta pesquisa resultou na obtenção de 22 isolados de fungos endofíticos, obtidos a partir das folhas de *B. tomentosa*. Estes isolados foram testados contra as bactérias *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis* e *Shigella flexneri*, que foram as espécies sensíveis ao extrato aquoso da planta. Estas bactérias foram selecionadas para

determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos fúngicos. Destes 22 fungos, 7 apresentaram atividade antimicrobiana (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) de fungos endofíticos isolados de *B. tomentosa* contra as bactérias *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis* e *Shigella flexneri*.

Fungo endofítico	CIM (µg/ml)		
	Bactéria		
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis.</i>	<i>Shigella flexneri</i>
FC12	25	25	50
FC13	100	100	-
FC31	50	25	100
FC49	50	50	-
FC53	50	50	-
FC81	25	50	-
FC93	-	-	25

* (-) Não houve inibição nas concentrações testadas: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,6; 0,78 mg/mL.

** CIM – Concentração Inibitória Mínima.

O uso de isolados fúngicos de folhas de *B. tomentosa* na literatura é inexistente, sendo este o primeiro trabalho a testar seu efeito antimicrobiano e, portanto, não há dados comparativos. Os extratos fúngicos que apresentaram atividade antimicrobiana mais abrangentes foram os obtidos dos isolados FC12 e FC31 (inibiram as três bactérias avaliadas, *S. typhimurium*, *S. epidermidis* e *S. flexneri*). Em todos os extratos fúngicos avaliados, pelo menos um foi capaz de inibir as bactérias na concentração de 25 µg/ml, sendo a menor concentração inibitória de extrato fúngico observada. Ressalta-se que as *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. compõem a lista de agentes patogênicos prioritários da Organização Mundial da Saúde para a produção e desenvolvimento de novos antibióticos, reforçando a importância desses resultados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

A atividade antimicrobiana das famílias químicas contra bactérias é classificada na ordem: fenóis > aldeídos > cetonas > álcoois > éteres > hidrocarbonetos (NOWAK et al., 2012; FADIL et al., 2018). Além dos compostos químicos já mencionados identificados nos frutos da *B. tomentosa*, Girondi et al., (2017) identificaram os compostos: ácido gálico, ácido quínico, kaempferol, epicatequina, ácido elágico e vitexina e Eschweilenol C nas folhas, com atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Os resultados encontrados na atual pesquisa correspondem ao padrão mencionado, reforçando a potência dos ácidos fenólicos predominantes nessa planta. Possivelmente, os fungos endofíticos presentes nas folhas sintetizam partes destes compostos através de suas vias metabólicas secundárias, inibindo os mesmos micro-organismos sensíveis ao extrato aquoso das folhas utilizado como triagem de patógenos neste estudo. Ressalta-se que questões como localização geográfica, clima, pragas e condições variadas na rizosfera podem causar variação dos constituintes químicos de plantas do mesmo gênero e espécie (JAYATILAKE e MUNASINGHE, 2020).

Brighenti et al. (2017) testaram a atividade antifúngica de extratos de *B. tomentosa* contra fungos leveduriformes e observaram atividade antibiofilme em *Candida albicans* a partir de ação dos ácidos elágico e gálico.

Nesta pesquisa foi identificado controle de crescimento do fungo filamentosso *R. stolonifer*, demonstrando uma potencial utilização destes fungos como agentes de controle biológico. O isolado FC123 foi capaz de inibir 53% o crescimento de *R. stolonifer* através da difusão de substâncias. Apesar de outros métodos químicos e térmicos serem comuns no controle de *R. stolonifer* em alimentos, a busca de novos agentes antimicrobianos à base de plantas e micro-organismos tem sido intensa devido à resistência do fungo aos fungicidas sintéticos (ELIZEI et al., 2016).

O fungo *Rhizopus stolonifer* é o agente causador da podridão mole em frutos, considerado um dos principais causadores de doenças pós-colheita, responsável por cerca de 50% de perda de frutos que seriam comercializados (BASSETTO et al., 2007).

Seu controle é de grande interesse comercial, biotecnológico, social e ambiental, sendo o controle biológico um método alternativo e eficiente na prevenção da deterioração pós-colheita de frutos, e conseqüentemente redutor da quantidade de resíduos químicos aplicados nesses alimentos (BONILLA, 2019).

CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo a explorar fungos endofíticos de *Buchenavia tomentosa* e avaliar suas potenciais atividades antimicrobianas *in vitro*. Os isolados FC12 e FC31 foram eficazes em inibir o crescimento dos três patógenos bacterianos avaliados. A concentração inibitória mínima observada de 25 µg/ml por pelo menos um endofítico contra os patógenos avaliados. Os isolados endofíticos testados constituem potenciais fontes de substâncias antimicrobianas. As confirmações poderão ser feitas após a verificação dos níveis de citotoxicidade e das caracterizações químicas. O isolado FC123 produziu substâncias difusíveis capazes de inibir o fungo fitopatogênico *R. stolonifer*. Novos estudos deverão ser realizados para identificar as espécies endofíticas e as substâncias antimicrobianas por elas produzidas

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 429435/2018-5 e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Programa Pró-Amazônia, Número: 23038.010315/2013-66. Agradecemos ainda à técnica Adrielly pelo trabalho realizado junto ao Herbário da Universidade Estadual do Tocantins no depósito da exsicata da planta *B. tomentosa*.

REFERÊNCIAS

- ALAMGIR, A. N. M. Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1. Progress in Drug Research, 73. Chapter 1, p. 2, 2017.
- ATEF, N. M.; SHANAB, S. M.; NEGM, S.I.; ABBAS, Y. A. Evaluation of antimicrobial activity of some plant extracts against antibiotic susceptible and resistant bacterial strains causing wound infection. Bulletin of the National Research Centre, v. 43, n. 144, 2019.
- AYUKEKBONG, J. A.; NTEMGWA, M.; ATABE, A. N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies. Antimicrobial Resistance & Infection Control, v. 6, n. 47, 2017.
- BASSETTO, E.; AMORIM, L.; BENATO, E. A.; GONÇALVES, F. P.; LOURENÇO, S. A. Efeito da irradiação UV-C no controle da podridão parda (*Monilinia fructicola*) e da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em pós-colheita de pêssegos. Fitopatologia Brasileira, v. 32, n. 5, p. 393-399, 2007.

BATISTA, A. L. Avaliação da atividade antimicrobiana e antiradicalar dos extratos e substâncias dos frutos de *Buchenavia tomentosa* – Eichler (Combretaceae) e *Ouratea spectabilis* Aubl. (Ochnaceae). Campo Grande; 2011. [Tese – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

BEUTLER, J. A.; CARDELLINA, I. I. J. H.; MCMAHON, J. B.; BOYD, M. R.; CRAGG, G. M. Anti-HIV and Cytotoxic Alkaloids from *Buchenavia capitata*. *Journal of Natural Product*, v.55, n.2, p.207-213, 1992.

BRIGHENTI, F. L.; SALVADOR, M. J.; DELBEM, A. C. B. Systematic Screening of plant extracts from the Brazilian pantanal with antimicrobial activity against bacteria with cariogenic relevance. *Caries Research*, v. 48, n.5, p. 353–360, 2014.

BRIGHENTI, F. L.; SALVADOR, M. J.; GONTIJO, A. V. L.; DELBEM, A. C. B.; DELBEM, A. C. B.; SOARES, C. P.; OLIVEIRA, M. A. C.; GIRONDI, C. M.; KOGAITO, C. Y. Plant extracts: initial screening, identification of bioactive compounds and effects against *Candida albicans* biofilms. *Future Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 15-27, 2017.

BONILLA, C. M. Utilización de agentes de biocontrol para prevenir el deterioro de la fruta en poscosecha. Máster Universitario en Seguridad y Calidad de los Alimentos. Repositorio institucional de la Universidad de La Laguna. Disponível em: <<http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/17327>>. Acesso em: 09 de set de 2022.

CASTELLANI, A. Maintenance and Cultivation of Common Pathogenic Fungi of Man in Sterile Distilled Water. Further Researcher. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 70, p. 181-184, 1967.

CAVALCANTI FILHO, J. R. N.; SILVA, T. F.; NOBRE, W. Q.; OLIVEIRA DE SOUZA; L. I., SILVA E SILVA FIGUEIREDO, C. S.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. D.; FYHRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; HÆGGSTRÖM, C. A. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. *Journal of Ethnopharmacology*, v.79, n. 2, p. 169-177, 2002.

ELIZEI, V. G.; CHALFOUN, S. M.; BOTELHO, D. M. D. S.; REBELLES, P. P. R. Atividade antifúngica, in vitro, do óleo de café verde. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 83, 2016.

FADIL, M.; FIKRI-BENBRAHIM, K.; RACHIQ, S.; IHSSANE, B.; LEBRAZI, S.; CHRAIBI, M.; HALOUI, T.; FARAH, A. Combined treatment of *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils against *Salmonella typhimurium*: Optimization of antibacterial activity by mixture design methodology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, p. 211-220, 2018.

GUSMÃO, N. B.; SILVA, M. V.; DA SILVA, L. C. N.; CORREIA, M. T. D. S. Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions. *Pharmaceutical Biology*, v. 55, n. 1, p. 1521-1527, 2017.

GIRONDI, C. M.; OLIVEIRA, A. B.; PRADO, J. A.; KOGA-ITO, C. Y.; BORGES, A. C.; DELBEM, A. C. B.; PEREIRA, D. F. A.; SALVADOR, M. J.; BRIGHENTI, F. L. Screening of plants with antimicrobial activity against enterobacteria, *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus* spp. *Future Microbiology*, v.12, n.8, p. 671-681, 2017.

JAYATILAKE, P. L.; MUNASINGHE, H. Antimicrobial Activity of Cultivable Endophytic and Rhizosphere Fungi Associated with "Mile-a-Minute," *Mikania cordata* (Asteraceae). *BioMed Research International*, v. Jun 15, p. 5292571, 2020.

LOPES, D.; MARUO, V. Toxicidade de *Buchenavia tomentosa* – revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 23, n. 1, p. 1-13, 2015.

MANGANYI, M. C.; ATEBA, C. N. Untapped Potentials of Endophytic Fungi: A Review of Novel Bioactive Compounds with Biological Applications. *Microorganisms*, v. 8, n. 12, p. 1934, 2020.

MELLO, G. W., OLIVEIRA, D. M., CARVALHO, C. J., PIRES, L. V., COSTA, F. A., RIET-CORREA, F., & SILVA, S. M. Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Norte Piauiense. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30, 1-9, 2010.

NOWAK, A.; KALEMBA, D.; KRALA, L.; PIOTROWSKA, M.; CZYZOWSKA, A. The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere. *Food microbiology*, v. 32, n.1, p. 212-216, 2012.

OLIVEIRA, Y. L. C.; NASCIMENTO, DA SILVA L. C.; DA SILVA, A. G. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (*Combretaceae: Combretoideae*). *The Scientific World Journal*, v. 6, 2012: 849302, 2012.

OLIVEIRA, A. I. T. DE; MAHMOUD, T. S.; NASCIMENTO, G. N. L. DO; SILVA, J. F. M. DA; PIMENTA, R. S.; MORAIS, P. B. DE. Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Palm Leaf Extracts from Babaçu (*Attalea speciosa*), Buriti (*Mauritia flexuosa*), and Macaúba (*Acrocomia aculeata*). *The Scientific World Journal*, v. 2016, p. 1-5, 2016.

OLIVEIRA, G. R. F.; SILVA, M. S.; MARCIANO, T. Y. F.; PROENÇA, S. L.; SÁ, M. E. Crescimento inicial do feijoeiro em função do vigor de sementes e inoculação com *Bacillus subtilis* / early growth of common bean plants in response to vigour seeds and inoculation with *Bacillus subtilis*. *Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas*, v. 10(4), p. 439-448, 2016a.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PINTO, W S; ROSA L H ; SILVA, J. F. M. PIMENTA, R. S.. Diversity and antimicrobial activities of endophytic fungi of *Myrcia sellowiana* (Myrtaceae) from Tocantins. *Acta Horticulturae*, v. 905, p. 283-286, 2011.

RAO, M. M. V.; HARIPRASAD, T. P. N. In silico analysis of a potential antidiabetic phytochemical erythrin against therapeutic targets of diabetes. *In Silico Pharmacology*, v. 9, n. 5, 2021.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: Plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, p. 1109–1123, 2008.

SHARMA, P.; KUMAR, S. Bioremediation of heavy metals from industrial effluents by endophytes and their metabolic activity: Recent advances. *Bioresource Technology*, v. 339, 125589, 2021.

SIMÕES, C. M. O. et al. (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2001

TEODORO, G. R.; BRIGHENTI, F. L.; DELBEM, A. C.; DELBEM, Á. C.; KHOURI, S.; GONTIJO, A. V.; PASCOAL, A. C.; SALVADOR, M. J.; KOGA-ITO, C. Y. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. *Future Microbiology*, v. 10, n. 6, p. 917-927, 2015.

VASAN, N.; BASELGA, J.; HYMAN, D. M. A view on drug resistance in cancer. *Nature*, v. 575, p. 299–309, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017 <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> Acesso em 30 de outubro de 2022.

**Capítulo II - *In Vitro* Cytotoxic Effects and Mechanisms of Action
of Eleutherine Isolated from *Eleutherine plicata* Bulb in Rat
Glioma C6 Cells**

(Publicado na revista *Molecules* – A2 em Biotecnologia)

1. Introduction

Glioma is a fatal malignancy derived from the glial cell lineage with a high recurrence rate. Although less prevalent than other neoplasms, 60% are aggressive high-grade gliomas (grade IV), which migrate and strongly infiltrate the brain parenchyma [1–5]. Gliomas, in general, are responsible for approximately 38% of primary brain tumors, and represent more than 70% of all central nervous system (CNS) tumors, the most frequent and malignant being glioblastoma multiforme [6,7]. Glioblastomas have the highest proportion of malignancy and the worst prognosis of CNS tumors. Only 5.5% of patients usually survive for 5 years after diagnosis [8] and have a 1-year survival rate because of the limitations of treatment's approaches [9].

Treatment strategies for glioma differ, depending on tumor size, location, and distinct tumor subtype, and involve a combination of surgery, radiotherapy, and chemotherapy. Typically, glioma chemotherapy includes the antibody nimotuzumab and temozolomide, but their efficacy is low, and these tumors have poor prognosis [10–14]. In addition, gliomas develop resistance to numerous drugs [15–19]. Therefore, there is a real need for new antitumor agents to treat this deadly cancer, and efforts are ongoing to identify more efficient and active molecules to regulate the tumor's progression.

Several plants, such as *Eleutherine plicata*, *Eleutherine americana*, and *Cipura paludosa*, are important sources of chemicals and contain high levels of naphthoquinones, a class of natural products with diverse biological activities. Aqueous extracts of the dried bulbs of these herbs have been described to generate oxidative stress by inducing the deleterious endogenous formation of a bioactive oxygen-derived species that inhibits inflammation, promotes apoptosis, and exhibits important anticancer properties in different cancer cell lines, such as glioma (U-251), breast (MCF-7), ovary (NCI/ADR-RES), kidney (786-0), lung non-small cell (NCI-H460), colon (HT-29), HepG2 cells, and leukemia (K562) [20,21].

These effects are mainly related to the presence of naphthoquinones, more specifically eleutherine, isoeleutherine, and eleutherol (Figure 1) [20,22]. Previous works have demonstrated the antiproliferative effect of eleutherine and isoeleutherine isolated from a methanolic extract of *Cipura paludosa* bulbs in glioma (U251) and breast cancer (MCF-7) lines [20]. The results indicate that eleutherine is more cytotoxic than isoeleutherine. These compounds are epimeric isomers and have a 1,4-naphthoquinone moiety with only one structural difference, the β -methyl group of eleutherine and the α -

methyl group of isoeleutherine. Thus, it follows that the higher activity of eleutherine is related to the chirality of its pyran ring with the β -methyl group [20].

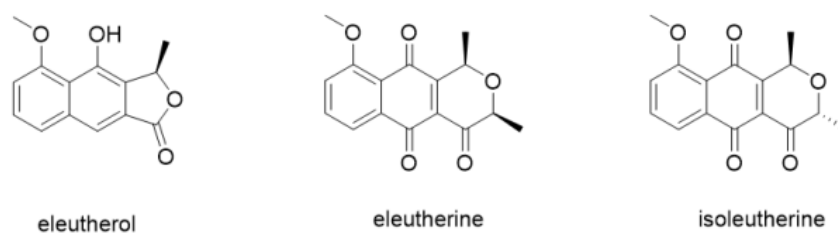


Figure 1. Chemical structures of eleutherol, eleutherine, and isoeleutherine.

Some studies suggest that naphthoquinones may exert their regulatory activities in cancer cells by acting on different signal transduction pathway family proteins, such as phosphatidylinositol-3-kinase/AKT and MAP kinase (MAPK) [23–25]. In addition, it is known that eleutherine reversibly inhibits the catalytic activity of human topoisomerase II by stabilizing the DNA–enzyme complex in the presence of ATP [26]. Thus, by inhibiting the activity of this enzyme, eleutherine can cause transient double-strand breakage in DNA and contribute to biological oxidative processes [27,28].

These activities open new opportunities for pharmacotherapy, especially for cancer [20,29,30]. However, eleutherine’s mechanism of action remains elusive. Thus, isolated eleutherine was used in this work to elucidate a possible mechanism of its action on C6 glioma cells.

2. Results

2.1. Characterization of the Compound Isolate

The compound isolated from *Eleutherine plicata* bulbs was obtained as a brownish yellow crystal. Starting from 3 g of the lyophilized ethanolic extract yielded over 49 mg of the pure compound, with 95% relative concentration (Figure 2, see Supplementary Figures S1 and S2), with MS (70 eV, EI) 272 (42), 257 (100), 243 (52), 214 (32), 157 (10), and 121 (25), and the probable molecular formula was deduced as C₁₄H₁₂O₄. The melting point was of 144–146 °C. The IR spectrum showed the presence of characteristic peaks, such as -C-H_{sp2} (2974 cm⁻¹), -C-H_{sp3} (2913), -C=O (1777 cm⁻¹), of benzene ring (1582cm⁻¹) absorptions. The molecular characterization data were compared with those in the literature [31].

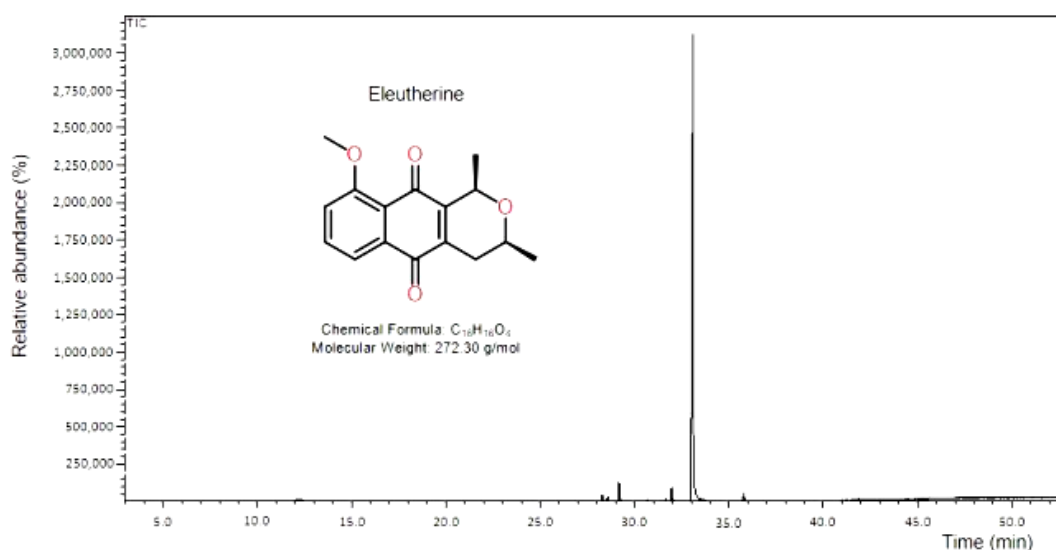


Figure 2. Chromatogram of eleutherine isolated from the bulbs of *Eleutherine plicata*. Peak area (95.03%) and retention time at 33.10 min.

2.2. Cytotoxic Effect of Eleutherine Treatment on C6 Cells

Eleutherine presented a cytotoxic effect on C6 cells. After 6 and 12 h of treatment, cell death was observed at 1 μM with IC₅₀ of 32.33 μM (± 1.25) and 28.46 μM (± 1.85), respectively (Figure 3A,B). During 24 h of treatment, a cytotoxic effect was observed at a concentration range of 0.05–100 μM , with an IC₅₀ of 4.98 μM (± 0.22) (Figure 3C). Thus, eleutherine reduced cell viability in a concentration- and time-dependent manner (Figure 3D).

2.3. Morphological Changes in C6 Cells after Eleutherine Treatment

No structural changes were observed in the control, which was characterized by the presence of fusiform cells and monolayer cells. Cells treated with eleutherine at 1 μM presented small morphological changes. However, cells treated at 20 and 40 μM showed structural changes characteristic of apoptosis, such as large and round cells and irregularly shaped cells with cytoplasmic shrinkage (white arrow). Treatment with eleutherine at 100 μM resulted in cell death (black arrow) (Figure 4).

2.4. Eleutherine Reduces Colony Formation by C6 Cells

Treatment with eleutherine at 20, 40, and 100 μM for 12 h resulted in decreases in colony formation (52.44%, 94.52%, and 99.18%, respectively) compared with that observed in the untreated group. No reduction in colony formation was observed at 1 μM eleutherine (Figure 5).

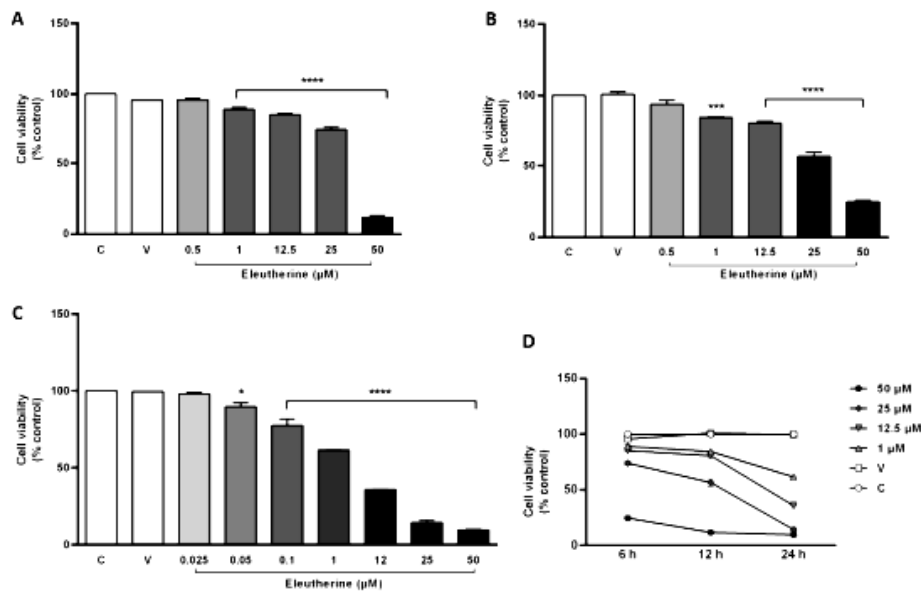


Figure 3. Eleutherine reduced the viability of glioblastoma cells as measured by the MTT assay. Cells were treated with different concentrations of eleutherine for 6 h (A), 12 h (B), and 24 h (C). (D) Cell viability curve showing the concentration and time-dependence of eleutherine's effect. Data are presented as the mean \pm SEM of three independent trials. Here, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ vs. untreated control (ANOVA, Tukey's post hoc test); C, control; V, vehicle.

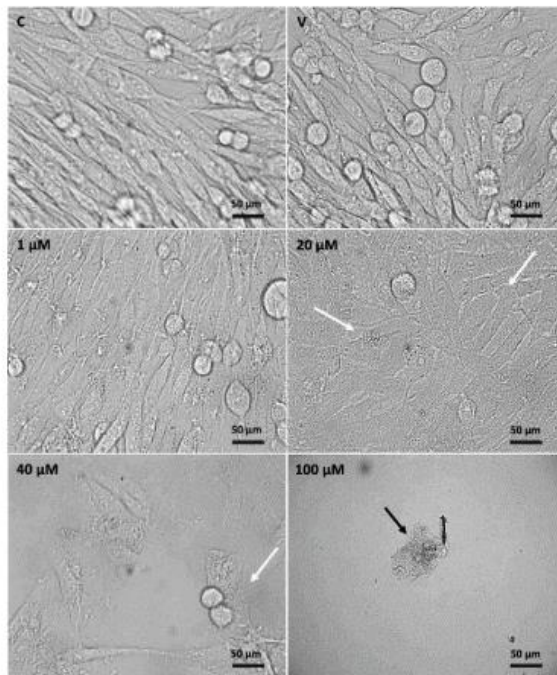


Figure 4. Morphological alterations in untreated C6 cells and after treatment with eleutherine at different concentrations (1, 20, 40, and 100 μM) for 12 h. Cells were examined using a phase-contrast microscope (Leica DMI6000B). White arrow indicates irregularly shaped cells with cytoplasmic shrinkage and black arrow indicates cell death. Images were taken using a 63 \times objective; C, control; V, vehicle.

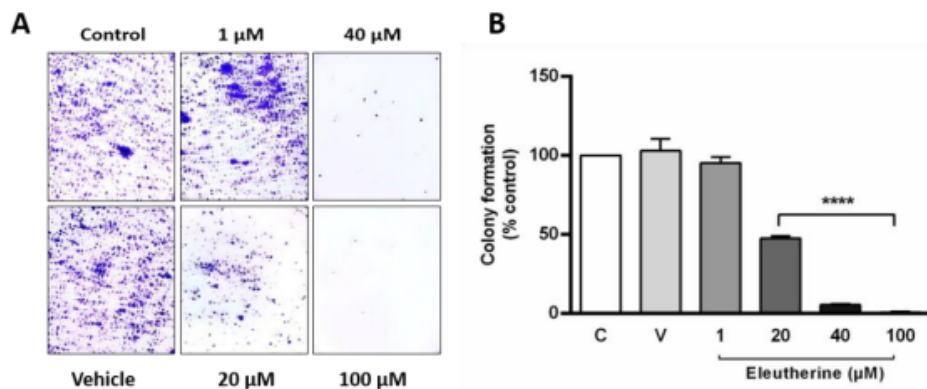


Figure 5. Eleutherine reduces colony formation in C6 cells. (A) C6 cells stained with crystal violet after eleutherine treatment for 12 h. (B) Graphic quantification of the colony numbers. Data are presented as the mean \pm SEM of three independent trials. Here, **** $p < 0.0001$ vs. untreated control (ANOVA, Tukey's post hoc test).

2.5 Eleutherine Induces C6 Cell Apoptosis

The annexin V–PI assay was used to confirm apoptotic cell death caused by eleutherine. The C6 cells were treated with different concentrations of eleutherine (1

μM , 20 μM , and 40 μM) and displayed increased numbers of apoptotic cells, mainly in the late stages of apoptosis, as follows: at 1 μM , 57%; at 20 μM , 44.4%; and, at 40 μM , 77%, compared with the control and positive control (camptothecin), as shown in Figure 6. Our results demonstrate that eleutherine induces apoptosis in a dose-dependent manner to a level higher than that observed in the positive control.

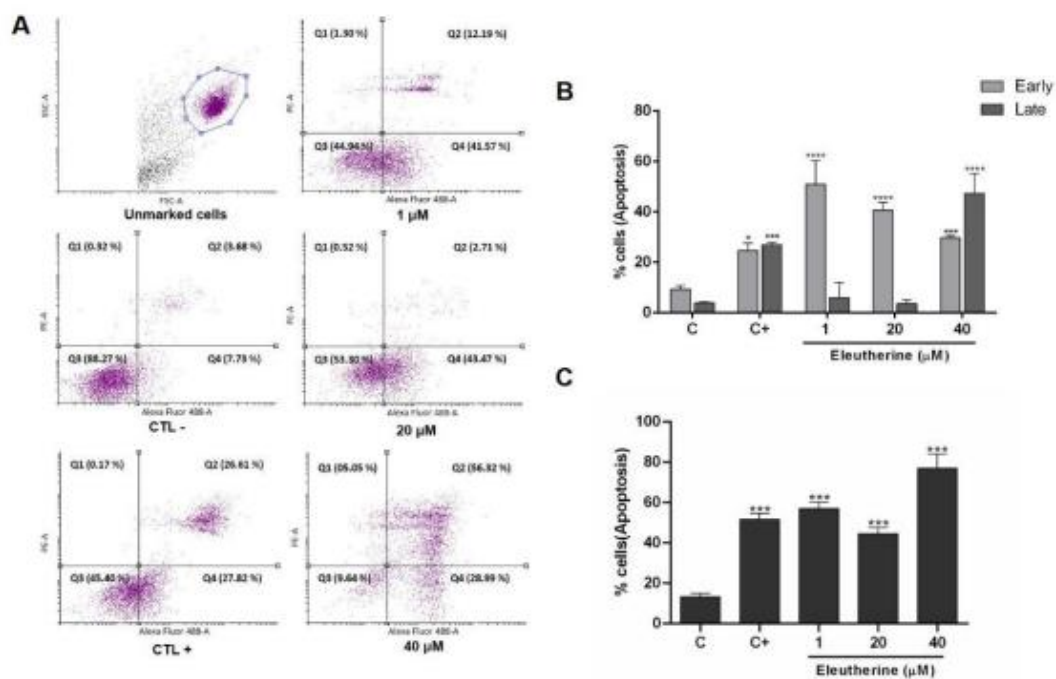


Figure 6. Eleutherine induces apoptosis in C6 cells. The cells were treated with eleutherine (1, 20, and 40 μM) for 24 h. (A) Cells were stained with annexin V-FITC and propidium iodide (PI) and subjected to flow cytometry analyses. Early apoptotic cells were in the Q4 quadrant and late apoptotic cells were in the Q2 quadrant. (B) Quantification of the percentage of early and late apoptotic C6 cells. (C) Quantification of the percentage of total apoptotic C6 cells. Here, * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ compared with untreated control (ANOVA, Tukey's post hoc test); C, control; C+, positive control (camptothecin at 5 μM).

2.6 Eleutherine Reduces the Expression of pAKT in C6 Cells

The expression of phosphorylated AKT was reduced after treatment with eleutherine by 48.84% at 20 μM and by 39.27% at 40 μM (Figure 7). Thus, the PI3K/AKT pathway in the glioma cells must be inhibited by the action of eleutherine.

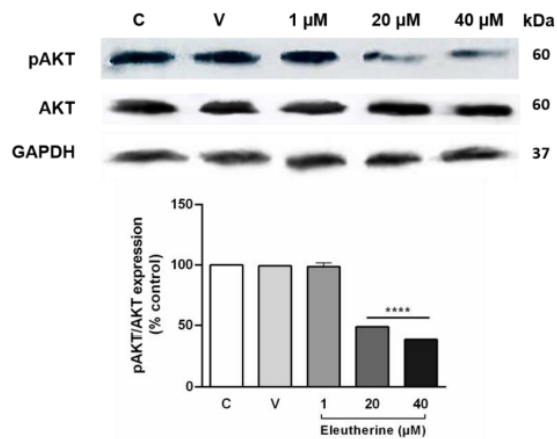


Figure 7. Eleutherine treatment reduced AKT phosphorylation in C6 cells. The expression of pAKT and AKT, and of GAPDH as the control protein, was detected by western blotting. The pAKT:AKT ratio is expressed as a percentage. The eleutherine treatment groups (20 and 40 μM) showed a greater reduction in AKT phosphorylation than was observed in the untreated group. Data are presented as the mean \pm SEM of three independent trials. Here, **** $p < 0.0001$ vs. untreated control (ANOVA, Tukey's post hoc test); C, control; V, vehicle.

2.7 Eleutherine Reduces Telomerase (*TERT*) mRNA Expression

Eleutherine treatment reduced *TERT* expression in a dose-dependent manner at 1 μM (17.1%), 20 μM (37.3%), and 40 μM (45.8%). The results suggest that after treatment of glioma cells with eleutherine there was a loss of telomerase activity that may have induced cell death (Figure 8).

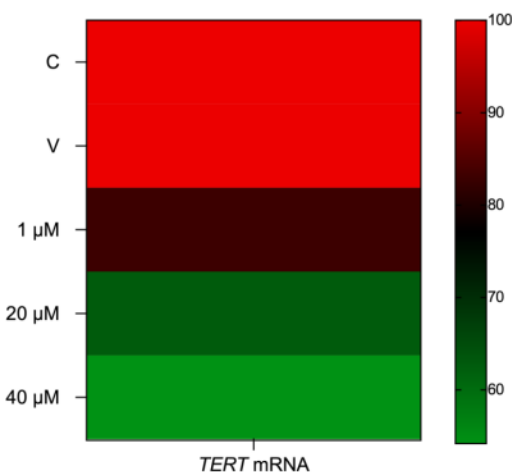


Figure 8. Heat map correlating eleutherine treatment with *TERT* mRNA expression in glioma cells. The color of each rectangle indicates the value of the Pearson correlation coefficient (ρ) between the eleutherine-treated groups and *TERT* mRNA expression.

3. Discussion

Naphthoquinones are significantly cytotoxic to different types of tumor cell lines. Recent evidence indicates that the antiproliferative activity of *Eleutherine plicata* is due to the presence of the three main naphthoquinones, namely eleutherine, isoeleutherine, and eleutherol [21]. Treatment of C6 cells with eleutherine resulted in a dose- and time-dependent change in cell viability. As expected, the IC_{50} decreased with the treatment time, reaching 4.98 μ M in cells exposed up to 24 h, demonstrating the effectiveness and potency of eleutherine. These findings are similar to those obtained with other naphthoquinone derivatives in primary cultures of cancer cells [30]. Eleutherine and isoeleutherine isolated from the bulbs of *C. paludosa* exhibited promising cytotoxicity against glioma (U-251), with IC_{50} values between 2.6 and 13.8 mg/mL [20].

The IC_{50} value obtained in our experiment is comparable to those reported in the literature. In addition, it was possible to verify that eleutherine does not have cytotoxic effects on normal glial cells (see Supplementary Figure S3), thus, proving its therapeutic potential and its safety in regard to healthy cells. From these results, we highlight the significant cytotoxic effect of eleutherine on C6 cells reported here.

Cancer cells, such as glioma cells, cause the failure of efficient cellular response and disable the inhibition of apoptosis. Our data indicate that eleutherine was able to induce apoptosis in C6 cells. Treatment resulted in increases in the apoptosis rates when analyzed by FITC-Annexin V/PI staining. The C6 cells treated with 40 μ M eleutherine showed an increased rate of apoptosis, similar to a previous study with another naphthoquinone [32,33]. These data support the hypothesis that there is a correspondence between the IC_{50} and the inhibition of proliferation and a high apoptosis rate.

Phase-contrast microscopy revealed structural changes produced by eleutherine. Cells treated with 20 μ M, 40 μ M, and 100 μ M eleutherine retracted, decreased in size, and underwent significant cytoplasmic shrinkage, similar to cells undergoing apoptosis. These results clearly indicate that decreased cell size and cytoplasmic shrinkage may be related to cell death [34].

Moreover, through the colony formation assay, it was possible to observe the antiproliferative effect of eleutherine on cultured cells. The cells treated with 20 μ M eleutherine formed significantly fewer colonies, and treatment with 40 μ M and 100 μ M eleutherine almost completely inhibited the formation of colonies. Interestingly, the ability to form colonies is a sensitive indicator of undifferentiated cancer stem cells

[35,36]. These results indicate that eleutherine can act on stem cells, a therapeutic strategy which prevents cancer from relapsing.

Treatment with eleutherine inhibited the migration of glioblastoma cells in comparison with the untreated control group and the vehicle group. With 1 μM eleutherine, it was possible to observe a reduction in the proliferation of cells and, at 20 μM , the cells showed changes in morphology, suggesting apoptosis. The morphology was totally altered in a dose-dependent way at 12, 24, and 48 h. These findings corroborate the results of the cell viability assay, highlighting the considerable antitumor potential of eleutherine, similar to other naphthoquinones, in an *in vitro* model of glioblastoma [23–25,32,33,37,38].

The AKT pathway is important in the genesis of several types of cancer, being overexpressed and playing critical roles in the survival, proliferation, invasion, and migration of cancer cells. This pathway is vital in the development of glioma cells and related to metabolism, epithelial–mesenchymal transition, and angiogenesis, allowing the glioma to acquire a high degree of invasiveness and malignancy by bypassing the mechanisms of apoptosis [37,39–41]. In our study, we found that eleutherine decreased the expression of p-Akt and inhibited the PI3K/AKT pathway, resulting in glioblastoma cell death.

It is known that TERT is a component of telomerase, a reverse transcriptase ribonucleoprotein complex that maintains telomere length in cells with high proliferative ability, and that it plays a key role in cancer formation. Telomere maintenance is affected by TERT gene amplification and epigenetic changes, such as DNA methylation, TERT promoter germ line and somatic mutations, and TERT structural variants [42,43]. Catalytic inhibitors of topoisomerases act either by inhibiting the binding of the enzyme to DNA or by preventing it from cleaving the DNA, compromising its cellular repair capacity [44,45]. Our results suggest that eleutherine, as with other naphthoquinones, reduces the telomerase activity that is critical to glioma cells growth [38].

More recent studies confirm the interaction of the telomerase with various intracellular signaling pathways including the PI3K/AKT/mTOR pathway, which mainly participates in inflammation, the epithelial-to-mesenchymal transition, and tumor cell invasion and metastasis [46,47]. Thus, a decrease in phosphorylated AKT expression inhibits hTERT expression, thereby reducing proliferative capacity, altering the cell cycle, and promoting apoptosis in glioma cells.

The results indicate that eleutherine treatment reduced the expression of phosphorylated AKT and TERT in a dose-dependent manner. These mechanisms directly influence the cell cycle and cells' ability to undergo apoptosis, which are of great interest in research on new antineoplastic therapies.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material

The specimens of *Eleutherine plicata* used in this study were obtained from a private medicinal plant plot in the city of Palmas, Tocantins, Brazil. The exicata is deposited in the Herbarium of the Federal University of Tocantins under the code number 8214.

4.2. Production of Raw Extract

For the preparation of extracts, *Eleutherine plicata* of an average size of 5 cm were ground in a blender with 2 mL of distilled water and subjected to decoction for 2 min, under agitation, according to Baliza et al. (2022) [48]. The mixture was distributed in extraction funnels, and hexane was added to the desired final volume. The funnel mixture was homogenized and allowed to sit until phase separation occurred. The hexane fraction was subjected to rotary evaporation to concentrate the extract in the flask. The flask was washed with hexane to loosen the evaporate that had stuck to the flask wall, and the concentrated extract was distributed among smaller flasks, which were left open in an exhaust hood for final evaporation and further concentration of the extract. After cooling, the material was filtered through No. 4 Whatman filter paper.

4.3. Extraction and Isolation

Initially, the ethanol extract was fractionated according to Tewierik et al. (2006) [30]. It was resuspended in 50 mL of a methanol/water solution (1:1) for 24 h, and was then subjected to a liquid/liquid partition, using solvents of increasing polarities in the order hexane, chloroform, and ethyl acetate. Sequentially, the fractions were analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS). Considering the results of this analysis, the isolation of the main compounds was carried out through separation

by column chromatography, using silica gel as a stationary phase and hexane/ethyl acetate (90:10, 90:20, 85:15, and 80:20) as the mobile phase.

Next, the isolated compounds were characterized by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS), in a Shimadzu/GC 2010 device with a Shimadzu/AOC500 auto-injector and a MS2010 plus mass detector with electronic impact ionization (IE, 70 and V), equipped with a DB-5MS fused silica column (Agilent J&W Advances 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), with helium at 65 kPa as the carrier gas. The conditions were as follows: oven temperature started at 100 °C for 2 min, increased to 290 °C at 4 °C min⁻¹ and held for 6 min; injector and interface temperature was maintained at 250 °C; splitless 1 μL injection; helium was used as the carrier gas at a constant flow 0.75 mL min⁻¹, and the run time was 30 min. The scan range was m/z 80–400. Retention times was 33 min. The final characterization was performed by infrared spectroscopy, using a Shimadzu IRAffinity-1 spectrometer operating with Fourier transform.

4.4. Cell Culture

Rat C6 glioblastoma cells (CCL-107™, ATCC) were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and maintained in an incubator at 37 °C with 5% CO₂, with the medium changed every 2 days. To perform the experiments, cells were washed with PBS and dissociated with 0.05% trypsin-EDTA, followed by centrifugation (1500 rpm for 3 min). After counting, cells were resuspended in culture medium and used to carry out the proposed assays.

Primary cultures of Müller cells were obtained from 9-day-old embryos. Retinal tissue was collected, and cells were distributed in 24-well plates (1 × 10⁶ cells/well). Cultures were grown for 10 days in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and kept in an incubator at 37 °C with 5% CO₂.

4.5. Cell Cytotoxicity Assay

Cells were plated (2 × 10⁴ cells/well) in 96-well plates and treated with eleutherine at different times and concentrations (0.5–50 μM for 6 h and 12 h, and 0.025–50 μM for 24 h). After the treatment period, the cells were incubated for 2 h with 0.5 mg/mL MTT solution (thiazolyl blue tetrazolium bromide—M2128, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,

USA) in serumfree DMEM. Absorbance was measured with a microplate reader (BioRad, Hercules, CA, USA) at 570 nm. The results obtained were plotted with the mean and standard deviation of samples expressed as a percentage of the control value. We used GraphPad Prism 9 software to calculate the IC₅₀.

4.6. Morphological Analysis of Eleutherine-Treated C6 Glioma Cells

Morphological alterations of C6 glioma cells were examined with a phase-contrast microscope (Leica DMI6000B). Cells were seeded in 12-well plate and incubated for 12 h with eleutherine at different concentrations (1 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 100 μ M). Images were taken using a 63 \times objective.

4.7. Wound Healing/Scratch Migration Assay

A 12-well plate cell migration assay was performed to estimate the effect of eleutherine on C6 migration capacity. After 12 h of cell culture, a transverse lesion was made in the central surface of each well. Cells were treated with eleutherine at different concentrations (1 μ M, 20 μ M, 40 μ M, and 100 μ M). Cell migration to the injured area was followed by image capture using a digital camera coupled to an inverted microscope (Leica DMI6000B), using a 10 \times objective, at 0, 12, 24, and 48 h of treatment.

4.8. Colony Formation Assay

A colony formation assay was performed to evaluate the effect of eleutherine on cell proliferation. The C6 cells were used to seed a 12-well plate. After 24 h of culture, they were treated with eleutherine (1, 20, 40, and 100 μ M) for 12 h. Cells were washed with PBS and dissociated with trypsin–EDTA (700 μ L, 5 min). Quantification was made in a Neubauer chamber (1:1) in a 0.4% trypan blue solution. An aliquot of 1000 viable cells from each group was used to seed a 6-well plate and cultured for 7 days, with the medium changed every 2 days. Cultures were then washed with PBS and stained with 0.25% crystal violet/50% ethanol for 30 min.

4.9. Annexin V-FITC–Propidium Iodide (PI) Assay

Apoptosis/necrosis analysis was performed with the annexin V–FITC kit (Invitrogen). Cells were cultivated in a 12-well plate and treated with eleutherine (1, 20, and 40 μ M) for 12 h. After that, cells were treated according to the manufacturer's protocol. In each sample, 1 μ L of annexin V–FITC and 2.5 μ L of PI (250 μ g/mL) were added and incubated for 10 min in an ice bath protected from light. The volume was made up to 250 μ L with binding buffer and analyzed using a flow cytometer (BD FACSCanto II). Camptothecin (Sigma-Aldrich) was used as positive control (5 μ M). The samples were analyzed using the flow cytometer with BD FACSDiva software, and a total of 10,000 events were collected for each sample and analyzed using the Flowing Software 2.5.1 (Turku, Finland). The final results were analyzed by cell percentage in each quadrant.

4.10. Western Blotting

The C6 cells were treated with eleutherine (1, 20, and 40 μ M) for 12 h, after which cell lysates were prepared. Each lysate (60 μ g of protein) was submitted to 10% SDS-PAGE gel electrophoresis. Gels were electrotransferred to nitrocellulose membranes (Hybond ECL, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) by use of a membrane transfer system (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% skim milk at room temperature for 1 h, followed by overnight incubation with primary antibodies anti-AKT (cat.no.9272, Cell Signaling Technology) and anti-phospho-AKT (Ser473) (cat.no.9271, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) in 1:1000 dilution, and anti-GAPDH (C terminus) (SAB2500450, Sigma-Aldrich), dilution 1:500. After washing, the membranes were incubated with the secondary antibodies goat anti-mouse IgG, peroxidase conjugated in 1:2500 dilution, and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody used at 1:2500 (NIF824, GE Healthcare) for 1 h. Protein expression was detected using a chemiluminescent substrate kit (Merck Millipore, Burlington, MA, USA), and the images were captured by a ChemiDoc system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.11. Real-Time Quantitative PCR Assay

Total RNA was extracted with TRI reagent (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's instructions. The RNA concentration and quality were determined using a NanoDrop spectrophotometer (Kisker Biotech, Steinfurt, Germany) and 1% agarose gels. Complementary DNA was synthesized using high-capacity cDNA archive (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). The TERT mRNA expression (Rn01409457_m1) was evaluated by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) with primers and TaqMan probes purchased as Assays-on-Demand Products for Gene Expression (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). The GAPDH gene (Rn01462662_g1) was selected as an internal control for RNA input and reverse transcription efficiency. All real-time qRT-PCR reactions were performed in triplicate for the hTERT and GAPDH genes. Data were previously analyzed with the $2^{-\Delta C_t}$ method and subsequently by relative quantification of the genes' expression, which was calculated according to Livak and Schmittgen (2001) and Arocho et al. (2006) [49,50].

4.12. Ethics Statement

This study was approved by the Committee of Ethics of Animal Experiments of the Federal University of Pará (CEUA/UFPA 9381260919). We followed the guidelines found in the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the experiments were carried out in compliance with the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, Brazil).

4.13. Statistical Analysis

The data are expressed as the means \pm SEM. The ANOVA followed by Tukey's post hoc method using the statistical program GraphPad Prism 9. The significance levels are indicated as * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, and **** $p < 0.0001$.

4. Conclusions

In conclusion, our results suggest that eleutherine has cytotoxic and antiproliferative activity in glioma cells and induces their death by inhibiting the PI3K/AKT/telomerase pathway. This opens the important possibility that eleutherine is a viable cancer treatment, which should be further tested and studied in an *in vivo* model.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27248850/s1>, Figure S1: Spectrum of mass (70 eV) of eleutherine isolated from the bulbs of *Eleutherine plicata*; Figure S2: Spectrum of FT-IR (KBr) of eleutherine isolated from the bulbs of *Eleutherine plicata*; Figure S3: Eleutherine is nontoxic to nonneoplastic (glial) cells as analyzed by MTT assay.

References

1. Schwartzbaum, J.; Fisher, J.L.; Aldape, K.D.; Wrensch, M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2006, 2, 494–503. [CrossRef] [PubMed]
2. Wen, P.Y.; Kesari, S. Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.* 2008, 359, 492–507. [CrossRef] [PubMed]
3. Cloughesy, T.F.; Cavenee, W.K.; Mischel, P.S. Glioblastoma: From Molecular Pathology to Targeted Treatment. *Annu. Rev. Pathol.* 2014, 9, 1–25. [CrossRef] [PubMed]
4. Chen, D.L.; Hu, M.G.; liu, Y.Y.; Li, R.T.; Yu, M.; Xu, X.D.; Ma, G.X. New Naphthalene Derivatives from the Bulbs of *Eleutherine americana* with Their Protective Effect on the Injury of HUVECs. *Molecules* 2018, 23, 2111. [CrossRef] [PubMed]
5. Chokshi, C.R.; Brakel, B.A.; Tatari, N.; Savage, N.; Salim, S.K.; Venugopal, C.; Singh, S.K. Advances in Immunotherapy for Adult Glioblastoma. *Cancers* 2021, 13, 3400. [CrossRef]
6. Behin, A.; Xuan-Hoang, K.; Carpentier, A.F.; Delattre, J.Y. Primary brain tumors in adults. *Lancet* 2003, 361, 323–331. [CrossRef]
7. Lapointe, S.; Perry, A.; Butowski, N.A. Primary brain tumors in adults. *Lancet* 2018, 392, 432–446. [CrossRef] [PubMed]

8. Ostrom, Q.T.; Patil, N.; Cioffi, G.; Waite, K.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013–2017. *Neuro Oncol.* 2020, 22, 1–96. [CrossRef]
9. Fernandes, C.; Costa, A.; Osório, L.; Lago, R.C.; Linhares, P.; Carvalho, B.; Caeiro, C. Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. *Codon Publ.* 2017, 11, 197–241.
10. Stupp, R.; Hegi, M.E.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Taphoorn, M.J.B.; Janzer, R.C.; Ludwin, S.K.; Allgeier, A.; Fisher, B.; Belanger, K.; et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009, 10, 459–466. [CrossRef]
11. Oh, J.; Sahgal, A.; Sanghera, P.; Tsao, M.N.; Davey, P.; Lam, K.; Symons, S.; Aviv, R.; Perry, J.R. Glioblastoma: Patterns of Recurrence and Efficacy of Salvage Treatments. *Can. J. Neurol. Sci.* 2011, 38, 621–625. [CrossRef] [PubMed]
12. Jackson, C.; Choi, J.; Khalafallah, A.M.; Price, C.; Bettegowda, C.; Lim, M.; Gallia, G.; Weingart, J.; Brem, H.; Mukherjee, D. A systematic review and meta-analysis of supratotal versus gross total resection for glioblastoma. *J. Neurooncol.* 2020, 148, 419–431. [CrossRef] [PubMed]
13. Harmouch, E.; Seitlinger, J.; Chaddad, H.; Ubeaud-Sequier, G.; Barths, J.; Saidu, S.; Désaubry, L.; Grandemange, L.; Massfelder, T.; Fuhrmann, G.; et al. Flavagline synthetic derivative induces senescence in glioblastoma cancer cells without being toxic to healthy astrocytes. *Sci. Rep.* 2020, 10, 13750. [CrossRef] [PubMed]
14. Nair, M.; Bolyard, C.; Lee, T.J.; Kaur, B.; Yoo, J.Y. Therapeutic Application of Brain-Specific Angiogenesis Inhibitor 1 for Cancer Therapy. *Cancers* 2021, 13, 3562. [CrossRef] [PubMed]
15. Colquhoun, A. Cell biology-metabolic crosstalk in glioma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2017, 89, 171–181. [CrossRef] [PubMed]
16. Nguyen, H.S.; Shabani, S.; Awad, A.J.; Kaushal, M.; Doan, N. Molecular Markers of Therapy-Resistant Glioblastoma and Potential Strategy to Combat Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1765. [CrossRef]
17. Barros, M.B.L.; Pinheiro, D.R.; Borges, B.N. Mitochondrial DNA Alterations in Glioblastoma (GBM). *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 5855. [CrossRef]
18. Ferreira, W.A.S.; Amorim, C.K.N.; Burbano, R.R.; Villacis, R.A.R.; Marchi, F.A.; Medina, T.S.; de Lima, M.M.C.; de Oliveira, E.H.C. Genomic and transcriptomic

characterization of the human glioblastoma cell line AHOL1 . *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2021, 54, 9571. [CrossRef]

19. Mckinnon, C.; Nandhabalan, M.; Murray, S.A.; Plaha, P. Glioblastoma: Clinical presentation, diagnosis, and management. *BMJ* 2021, 374, 1560. [CrossRef]

20. Campos, A.; Vendramini-Costa, D.B.; Fiorito, G.F.; Ruiz, A.L.T.G.; Carvalho, J.E.; Souza, G.M.R.; Delle-Monache, F.; Cechinel-Filho, V. Antiproliferative effect of extracts and pyranonaphthoquinones obtained from *Cipura paludosa* bulbs. *Pharm. Biol.* 2016, 54, 1022–1026. [CrossRef]

21. Gomes, A.R.Q.; Galucio, N.C.R.; Albuquerque, K.C.O.; Brígido, H.P.C.; Varela, E.L.P.; Castro, A.L.G.; Vale, V.V.; Bahia, M.O.; Burbano, R.M.R.; Molfeta, F.A.; et al. Toxicity evaluation of *Eleutherine plicata* Herb. extracts and possible cell death mechanism. *Toxicol. Rep.* 2021, 8, 1480–1487. [CrossRef] [PubMed]

22. Mahabusarakam, W.; Hemtasin, C.; Chakthong, S.; Voravuthikunchai, S.P.; Olawumi, I.B. Naphthoquinones, Anthraquinones and Naphthalene Derivatives from the Bulbs of *Eleutherine americana*. *Planta Med.* 2010, 76, 345–349. [CrossRef] [PubMed]

23. Chen, G.; Yue, Y.; Qin, J.; Xiao, X.; Ren, Q.; Xiao, B. Plumbagin suppresses the migration and invasion of glioma cells via downregulation of MMP-2/9 expression and inactivation of PI3K/Akt signaling pathway in vitro. *J. Pharmacol. Sci.* 2017, 134, 59–67. [CrossRef] [PubMed]

24. Matias, D.; Balça-Silva, J.; Dubois, L.G.; Pontes, B.; Ferrer, V.P.; Rosário, L.; Anália, C.; Echevarria, J.L.; Ribeiro, A.B.S.; Lopes, M.C.; et al. Dual treatment with shikonin and temozolomide reduces glioblastoma tumor growth, migration and glial-tomesenchymal transition. *Cell Oncol. (Dordr.)* 2017, 40, 247–261. [CrossRef] [PubMed]

25. Bernardo, P.S.; Guimarães, G.H.C.; De Faria, F.C.C.; Longo, G.M.C.; Lopes, G.P.F.; Netto, C.D.; Costa, P.R.R.; Maia, R.C. LQB-118 compound inhibits migration and induces cell death in glioblastoma cells. *Oncol. Rep.* 2020, 43, 346–357. [CrossRef] [PubMed]

26. Krishnan, P.; Bastow, K.F. Novel Mechanisms of DNA Topoisomerase I—Inhibition by Pyranonaphthoquinone Derivatives *Eleutherin*, a *Lapachone*, and *B Lapachone*. *Biochem. Pharmacol.* 2000, 60, 1367–1379. [CrossRef]

27. Andoh, T.; Ishida, R. Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta* 1998, 1400, 155–171. [CrossRef]

28. Pereyra, C.E.; Dantas, R.F.; Ferreira, S.B.; Gomes, L.P.; Silva-Jr, F.P. The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. *Cancer Cell Int.* 2019, 19, 207. [CrossRef]
29. Aminin, D.; Polonik, S. 1,4-Naphthoquinones: Some Biological Properties and Application. *J. Pharm. Soc. Jpn.* 2020, 68, 46–57. [CrossRef]
30. Kumar, P.; Mallya, P.; Jain, V. Naphthoquinones in the Treatment of Cancer. *J. Pharm. Sci. Res.* 2020, 12, 587–590.
31. Tewierik, L.M.; Dimitriadis, C.; Donner, C.D.; Gill, M.; Willems, B. Total synthesis of enantiopure 1,3-dimethylpyranonaphthoquinones including ventiloquinones E, G, L and eleutherin. *Org. Biomol. Chem.* 2006, 4, 3311–3318. [CrossRef] [PubMed]
32. Guo, N.; Miao, R.; Gao, X.; Huang, D.; Hu, Z.; Ji, N.; Nan, Y.; Jiang, F.; Gou, X. Shikonin inhibits proliferation and induces apoptosis in glioma cells via downregulation of CD147. *Mol. Med. Rep.* 2019, 19, 4335–4343. [CrossRef] [PubMed]
33. Ma, X.; Yu, M.; Hao, C.; Yang, W. Shikonin induces tumor apoptosis in glioma cells via endoplasmic reticulum stress, and Bax/Bak mediated mitochondrial outer membrane permeability. *J. Ethnopharmacol.* 2020, 263, 113059. [CrossRef] [PubMed]
34. Shi, M.; Cai, Q.; Yao, L.; Mao, Y.; Ming, Y.; Ouyang, G. Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells. *Cell Biol. Int.* 2006, 30, 221–226. [CrossRef]
35. Deleyrolle, L.P.; Reynolds, B.A. Identifying and enumerating neural stem cells: Application to aging and cancer. *Prog. Brain Res.* 2009, 175, 43–51.
36. Rajendran, V.; Jain, M.V. In Vitro Tumorigenic Assay: Colony Forming Assay for Cancer Stem Cells. *Methods Mol. Biol.* 2018, 1692, 89–95.
37. Zhang, F.Y.; Hu, Y.; Que, Z.Y.; Wang, P.; Liu, Y.H.; Wang, Z.H.; Xue, Y.X. Shikonin Inhibits the Migration and Invasion of Human Glioblastoma Cells by Targeting Phosphorylated β -Catenin and Phosphorylated PI3K/Akt: A Potential Mechanism for the Anti-Glioma Efficacy of a Traditional Chinese Herbal Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 23823–23848. [CrossRef]
38. Costa, D.C.; Rangel, L.P.R.; Martins-Dinis, M.M.D.C.; Ferreti, G.D.S.; Ferreira, V.F.; Silva, J.L. Anticancer Potential of Resveratrol, Lapachone and their analogues. *Molecules* 2020, 25, 893. [CrossRef]
39. Li, X.; Wu, C.; Chen, N.; Gu, H.; Yen, A.; Cao, L.; Wang, E.; Wang, L. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget* 2016, 7, 33440–33450. [CrossRef]
40. Rhun, E.L.; Preusser, M.; Roth, P.; Reardon, D.A.;

- van den Bent, M.; Wen, P.; Reifenberger, G.; Weller, M. Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treat. Rev.* 2019, 80, 101896. [CrossRef]
41. Behrooz, A.B.; Talaie, Z.; Jusheghani, F.; Łos, M.J.; Klonisch, T.; Ghavami, S. Wnt and PI3K/Akt/mTOR Survival Pathways as Therapeutic Targets in Glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 1353. [CrossRef] [PubMed]
42. Dratwa, M.; Wysoczanska, B.; Łacina, P.; Kubik, T.; Bogunia-Kubik, K. TERT-Regulation and Roles in Cancer Formation. *Front. Immunol.* 2020, 11, 589929. [CrossRef] [PubMed]
43. Aquilanti, E.; Kageler, L.; Wen, P.Y.; Meyerson, M. Telomerase as a therapeutic target in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2021, 23, 2004–2013. [CrossRef] [PubMed]
44. Jorge, P.M.; Oliveira, I.M.; Chiela, E.C.F.; Viau, C.M.; Saffi, J.; Horn, F.; Rosa, R.M.; Guecheva, T.N.; Henriques, J.A.P. Diphenyl Ditelluride-Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis: A Relation with Topoisomerase I Inhibition. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2015, 116, 273–280. [CrossRef]
45. Brazvan, B.; Ebrahimi, A.K.; Velaei, K.; Mehdipour, A.; Aliyari, Z.S.; Ebrahimi, A.; Ghorbani, M.; Cheraghi, O.; Charoudeh, H.N. Telomerase activity and telomere on stem progeny senescence. *Biomed. Pharmacother.* 2018, 102, 9–17. [CrossRef]
46. Dogan, F.; Avci, C.B. Correlation between Telomerase and mTOR pathway in Cancer Stem Cells. *Gene* 2018, 641, 235–239. [CrossRef]
47. Ghareghomi, S.; Ahmadian, S.; Zarghami, N.; Kahroba, H. Fundamental insights into the interaction between telomerase/TERT and intracellular signaling pathways. *Biochimie* 2021, 181, 12–24. [CrossRef]
48. Baliza, D.D.M.S.; Silva, J.F.M.S.; Ferreira, E.M.S.; Ferreira, I.M.; Silva, E.O.; Nascimento, J.L.M.; Pimenta, R.S. Screening of Endophytes for Anticancer Compounds. In *Endophytic Microbes: Isolation, Identification, and Bioactive Potentials*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2022.
49. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 2001, 25, 402–408. [CrossRef]
50. Arocho, A.; Chen, B.; Ladanyi, M.; Pan, Q. Validation of the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts. *Diagn. Mol. Pathol.* 2006, 15, 56–61. [CrossRef]

Capítulo III - Screening of Endophytes for Anticancer Compounds

(Parte metodológica publicada em: Screening of Endophytes for Anticancer Compounds. In Endophytic Microbes: Isolation, Identification, and Bioactive Potentials; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2022).

1. Introduction

Endophytic microorganisms colonize the internal tissues of plant species (roots, stem, fruits, leaves and seeds) without causing immediate negative effects, which can bring several benefits to the host plant, such as protection and growth promotion [1]. Within medicinal plants, they influence the formation of secondary metabolites, being reported the ability to produce distinctly aliphatic compounds, alkaloids, benzopyranones, chinones, phenolic acids, phytohormones, quinones, steroids, saponins, tannins, terpenoids, tetralones, xanthenes and others compounds of biotechnological interest [2; 3; 4; 5; 6].

Among the current methods of cancer treatment, chemotherapy is the most effective for the treatment of metastatic tumors, but it has characteristics of multi-resistance of cancer cells and side effects, triggering treatment inefficiency [7]. Hartwell [8] listed more than 3000 species of plants used in the treatment of cancer and there are several anticancer drugs with active ingredients of plant origin, but for the preparation of these drugs there are some difficulties such as extremely low amounts of active ingredients, severe deforestation and the difficulty in re-isolation of active ingredients due to changes in environment, season and geography [9].

In some cases, the difficulty with isolation of bioactive compounds from plants has made the extraction of new chemical compounds from endophytic derivatives an important object of study in recent years [10]. Thus, several studies involving higher plants have shown the association between endophytes and active metabolites, as well as their potential for medicinal use [11]. These potential endophytic microorganisms are favorable alternative sources for the synthesis of mimetic metabolites of interest to the host and prevent the overexploitation of host plants [12; 13].

The evolution of different morphological, biochemical and molecular techniques provides insight capable of targeting biological activity of novel secondary metabolites from endophytes monitoring the progression of cell death in any conditions. These techniques resulted in an enormous advantage in knowledge on the regulatory network it takes the cell to die. In addition, *in vitro* methods are important to show how these secondary metabolites work [14].

2. Materials

Obtaining active fungal colonies

- Endophytic fungi in Castellani, glycerol or other stock culture
- Petri dishes with Potato Dextrose Agar (PDA)
- Inoculation loop
- B.O.D.

Obtaining fungal colonies in liquid medium

- Petri plate with pure colonies of endophytic fungi
- YM broth (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% glucose)
- 250 mL Erlenmeyer
- Plastic straw (4 mm in diameter)
- Toothpicks
- Shaker incubator

Extraction of metabolites from endophytic fungi

- Extraction funnel
- Fungus grown in YM broth
- Dichloromethane P. A. ACS
- Rotary evaporator
- Small glass bottles
- Exhaust fume hood
- Flat bottom balloon

Processing of extracts and verification of metabolites

- Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS)
- Methanol/water solution (1:1)
- Hexane
- Chloroform
- Ethyl acetate
- Magnesium sulfate
- Helium gas

Cancer Cell Lines culture, reagent and Equipaments

- Cancer cell lines can be obtained from purchased from a cell bank
- Appropriated culture media, sera and reagents
- Cell Culture Plates (Multiwell plates)
- PEN STREP - Penicillin Streptomycin solution
- CMF – Calcium Medium free
- TRYPSIN/ EDTA solution
- Wash bath
- pHmeter
- automatic pipetters
- Centrifuge
- Refrigerates and freeze (-20 °C)
- Liquid Nitrogen (N₂) containers
- Sterilizer
- CO₂ incubator
- Lamina Flow
- Inverted microscope

Cytotoxicity Assays in Cancer Cell Lines

Trypan Blue protocol

- Cancer cell lines
- Pasteur Pipette
- PBS (Phosphate buffered saline)
- Trypan blue solution
- Hemocytometer chamber
- Optical Microscope

MTT colorimetric assay

- Cancer cell lines
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Acid Isopropanol
- HCl

- Microplate Reader

LDH

- Cancer cells lines
- 96 well flat-bottom plate
- Sodium Pyruvate
- NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen)
- KPO4 (Potassium phosphate buffer)
- Microplate Reader

Alamar Blue

- Cancer cell lines
- 10% Alamar blue solution
- Medium free-serum
- Excitation wavelength 530nm
- Emission Wavelength 590nm
- Fluorimeter

Colony formation assay

- Cancer cell lines
- Trypsin solution
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Ethanol
- Crystal violet
- Optical Microscope

Electron microscopic analysis

- Cancer cell lines
- PHEM buffer (MgCl₂-5mM; KCL-70mM; EGTA-10mM; HEPES-20mM; PIPES-60mM)
- Glutaraldehyde
- Formadehyde
- OsO₄ (Osmium tetroxide)

- PBS (Phosphate saline buffer)
- $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ (Potassium Ferrocyanide)
- $CaCl_2$ (Calcium Chloride)
- Epon Resin
- Uranyl acetate
- Lead citrate
- Ultramicrotome
- Nickel Grids 300 mesh
- Fume hood
- Transmission Electron Microscopy

Colony formation assay

- Cancer cell lines
- Trypsin solution
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Ethanol
- Crystal violet
- Optical microscope

Annexin V-FITC-propidium iodide (PI) assay

- Cancer cell lines
- Annexin V FITC Apoptosis KIT
- Propidium Iodide (PI)
- Binding Buffer (50mM HEPES, 700mM NaCl, 12,5 mM $CaCl_2$, pH = 7.4)
- FACS Tubes
- Flow Cytometer

Analysis of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$)

- Cancer cell lines
- JC1 - fluorescent carbocyanine dye
- 12, 24 or 96 well plates
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- PBS
- Flow Cytometer

Cell cycle analysis

- Cancer cell lines
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- PBS (Phosphate saline buffer)
- Ethanol
- CO₂ Incubator
- RNaseA
- Propide Iodide
- Flow Cytometer

Western blotting

- Cellular lysates
- Electrophoresis SDS PAGE gel
- Nitrocellulose membranes
- Primary and secondary antibody
- Nonfat milk
- Semidry transfer system
- Chemiluminescent substrate Kit
- Images captured by chemiDoc system

Caspase - 3 activity

- Cell-culture 96-well, flat-bottom microplate
- CHAPS buffer
- Chromogenic substrates acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide (Ac-DEVD-pNA)
- p-nitroaniline (pNA)
- Phosphate buffer
- Tris-HCl
- Microplate reader

3. Methods

Obtaining active fungal colonies

- With the aid of a sterile microbiological loop, remove one or two discs (1 cm in diameter) of the fungus (depending on the size of the colony grown), stored in Castellani, glycerol, or other storage method.
- Insert the disc in the center of the plate containing previously sterilized solid culture medium (Potato Dextrose Agar) and incubate at 25 ° C in B.O.D. for five days, or until pattern growth of the inserted colony is observed, as shown in Figure 1.

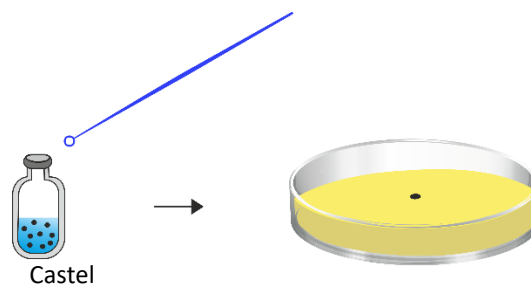


Figure 1 – Obtaining a fungal colony from stored endophytes.

Obtaining fungal colonies in liquid medium

- With the plates with the purified fungi, remove five discs with the aid of a straw and toothpick, previously sterilized, and transfer them to an Erlenmeyer containing 200 mL of previously autoclaved YM broth, as shown in Figure 2.
- Incubate at 25 ° C in Shaker, at a rotation of 120 rpm, for 14 days.

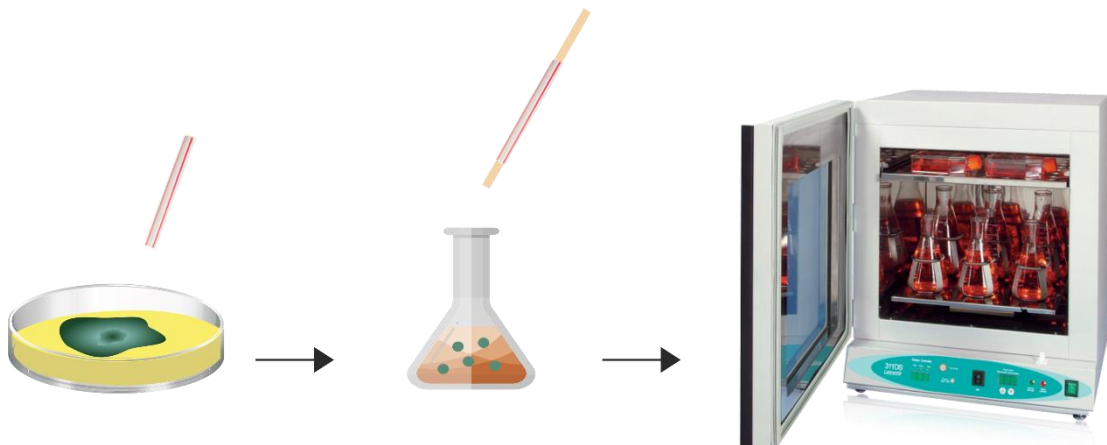


Figure 2 – Obtaining fungal colonies in liquid medium.

Extraction of metabolites from endophytic fungi

- Pour the YM broth with the fungal growth into the extraction funnel and top up with 1:1 dichloromethane. Shake to homogenize.
- Allow to decant until the water/dichloromethane separation, as shown in Figure 3.
- Remove the fraction of dichloromethane, which is at the bottom of the bottle, and put it to rotaevaporate.
- The rotating process evaporates the solvent, concentrating only the extract in the flask. Wash the flask with dichloromethane to loosen the evaporated and distribute in smaller flasks.
- Place the flasks to evaporate again in the exhaust hood.

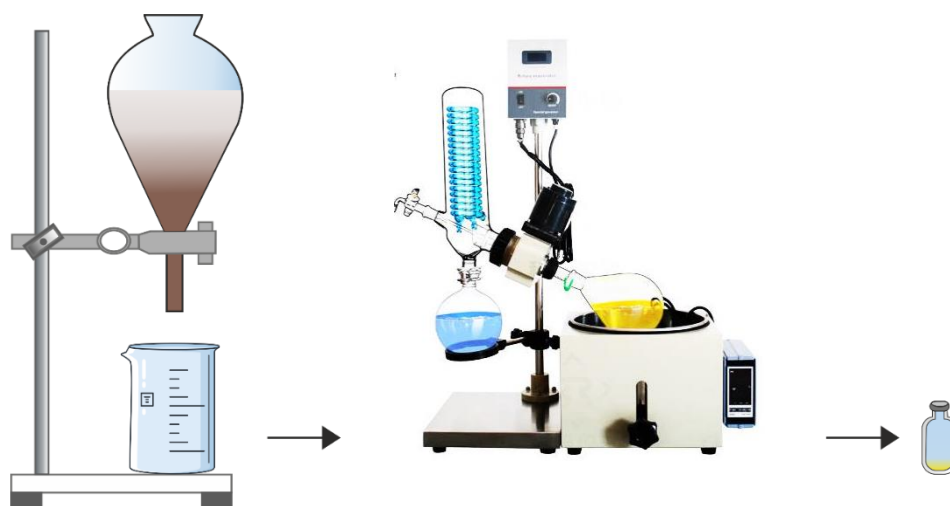


Figure 3 – Scheme for extracting metabolites from endophytic fungi.

Processing of extracts and verification of metabolites

- Resuspend approximately 2.7 g of the lyophilized material in 50 mL of a methanol/water (1:1) solution and then submit to a liquid/liquid partition (2 x 50 mL) using the solvents hexane, chloroform and ethyl acetate, respectively.
- In each fraction add anhydrous magnesium sulfate and filter again.
- Rotaevaporate excess solvent at reduced pressure and analyze by Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS): Shimadzu/CGMS-PQ2010SE apparatus, coupled to Shimadzu/AOC-5000 autoinjector and a mass detector

(Shimadzu MS2010 Plus) with electron impact (70 eV) equipped with a 30 meter long RTX-5MS fused silica column, 0.25 mm outside diameter and 0.25 μm inside diameter, as shown in Figure 4, using helium as a carrier gas, supporting a flow 1.03 ml/min.

- Soluble the sample in 2 μL of hexane and 1 μL must be subjected to experimental conditions, for example, as follows:
 - Injector temperature at 210 $^{\circ}\text{C}$
 - Detector temperature at 250 $^{\circ}\text{C}$
 - Helium gas as a drag in a flow of 3 ml / min
 - Injection divided in the proportion of 1/15
 - Set the column temperature from 90 $^{\circ}\text{C}$, with an increase of 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 250 $^{\circ}\text{C}$, ending with 5 minutes isothermal at this temperature.
- The substances identified in the fraction will show predominance peaks, as shown in figure 5.

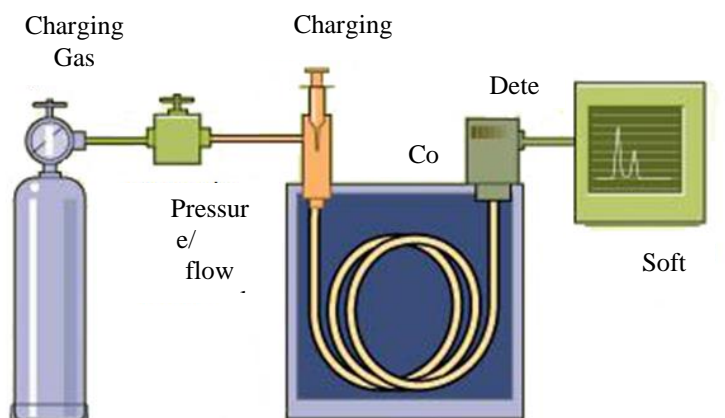


Figure 4 – Scheme of Gas Chromatograph coupled to Mass Spectrometer (GC-MS).

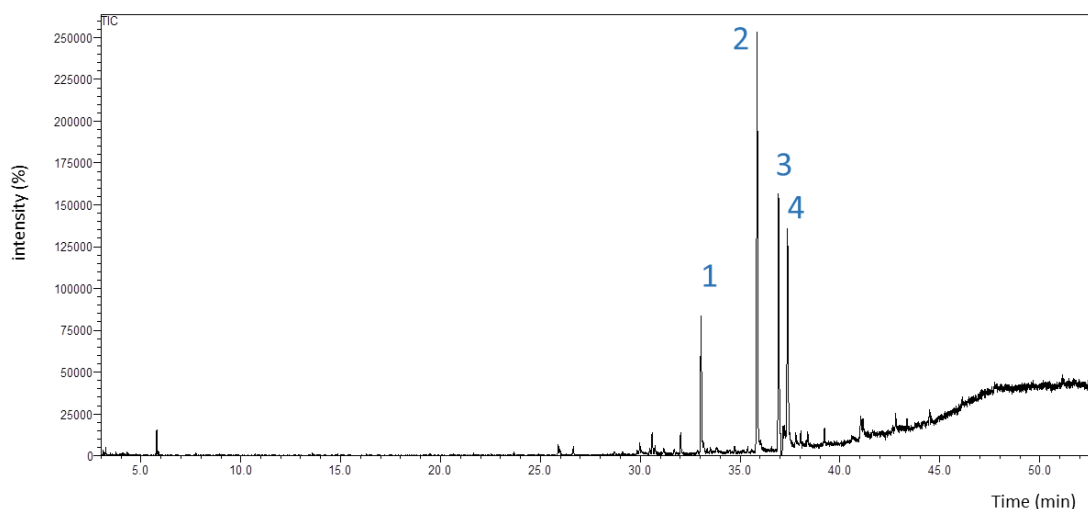


Figure 5 – Example of chromatogram of the hexane fraction from the ethanol extract of the roots of the medicinal plant *Eleutherine plicata*.

Anticancer analysis of bioactive compounds from endophytes

Cancer cells lines

- Maintain cancer cell line at 37°C, 5% CO₂ in 95% relative humidity in multiwell plates.
- Use media and sera appropriated for cancer cell line growth.
- View the cultures under a phase contrast inverted microscope.
- Remove a small aliquots of the cells for determination of cell numbers.
- Add the appropriate cell density for each experiment.
- Change the medium every third day for 14 days to obtain well differentiated monolayers of cancer cell line.

Perform bioactive compounds treatment

- Remove the existing culture medium from the cells and replace with new medium.
- Incubate cancer cell line culture with different concentrations of bioactive compounds.
- Untreated cells as control.
- Discard media from cell cultures after treatment with bioactive compounds.
- Incubate cancer cell line cultures in the presence of bioactive compounds for 6, 12, 24, 48 and 72 h.

- At the end of the incubation period, determine the cell number by cytotoxicity methods and methods to detect apoptotic cell death.

Trypan Blue Assay Protocol

- Determine the cell density using a hemocytometer.
- Prepare a 0.4% solution of trypan blue in buffered isotonic salt solution, pH 7.4 phosphate-buffered saline.
- Add 0.1 mL of trypan blue stock solution to 0.1 mL of cells.
- Load a hemocytometer and examine immediately under a microscope at low magnification.
- Count the number of blue staining cells and the number of total cells. Cell viability should be at least 95% for healthy log-phase culture.
- Take images with an optical microscope.

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Assay

- 10^6 cancer cells line in culture.
- Remove the existing culture medium from the cells and replace with new medium.
- Incubate the cells according to the standard treatment protocol.
- Discard media from cell cultures after treatment with bioactive compounds.
- Add 100 μ L of serum -free media and 20 μ L of MTT solution (5mg/ml) into each well.
- Incubate for 2 hours at room temperature in the dark until purple precipitate.
- Add 20 μ L DMSO or acid-isopropanol (100 μ L 0,04 N HCl in Isopropanolol) to dissolve the purple crystals.
- Measure the absorbance at 570 nm using a microplate reader.

LDH assay

- 10^6 cancer cell lines in culture.
- Remove the existing culture medium from the cells and replace with new medium.
- Incubate the cells according to the standard treatment protocol.
- Discard media from cell cultures after treatment with bioactive compounds.
- Add 200 μ L of serum -free media.
- 2,3 μ Mol of sodium pyruvate.
- 0,2 mg NADH in 0,1M KPO_4 into each well PH 7,0.
- Recorded automatically at 2s interval.

- Measure absorbance at 340 nm using a microplate reader.
- Enzyme activity expressed in (LDH U/ml).

Alamar blue Assay method

- 10^6 cancer cell in culture.
- Remove the existing culture medium from the cells and replace with new medium.
- Incubate the cells according to the standard treatment protocol.
- Discard media from cell cultures after treatment with bioactive compounds.
- Dilute Alamar blue stock solution to 1:1 with serum free- medium.
- Volume of 50 μ L/well.
- Final assay volume of 250 μ L.
- Final concentration of 10% alamar blue.
- Read fluorescence at excitation 530 nm, emission at 590 nm.

Colony formation assay

- 2.5×10^5 cancer cell in culture.
- Remove the existing culture medium from the cells and replace with new medium.
- Incubate the cells according to the standard treatment protocol.
- Trypsinize cells and plate 1×10^3 of viable cells.
- After 14 days, stain at least 50% of the cells during 30 min with 0.25% crystal violet.
- Take images with phase contrast microscope.

Annexin V-FITC-propidium iodide (PI) assay

- 100ul of cell suspension containing 10^4 cells culture.
- Remove the existing culture medium from the cells and replace with new medium.
- Incubate the cells according to the standard treatment protocol.
- Add 5 μ l of Annexin V-FITC.
- Add 5 μ l of PI.
- 15 min at room temperature in the darkness.
- 400 ul of binding buffer.
- Annexin V-FITC.
- Measure 100,000 events using the green channel FL1 for Annexin V-FITC and red channel FL3 for PI.

- Analyze by Flow Cytometer.

Analysis of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$)

- Seed 10^4 or 10^5 cells/mL in 12, 24 or 96 well-plates.
- Washing with cold PBS.
- Incubate the cells according to the standard treatment protocol.
- After incubation, centrifuge cells for 3-4 minutes at $400\times g$ at 4°C and aspirate the supernant.
- Add 500 μL PBS to suspend cells.
- Add 20 μM JC-1 (250 μl) for 15 min at room temperature.
- Measure a total of 100,000 events with the capture emissions set to 590 nm (red) and 530 nm (green).
- Analysis by Flow Cytometer.

Transmission electron microscopy (TEM) analysis

- Seed line cells (2×10^6) in 75 cm² flasks.
- Incubate cells with different concentration of the bioactive compounds.
- After 24 h, wash cells with PBS and fix them with 1% glutaraldehyde 4% freshly prepared formaldehyde, and 2.5% sucrose in 0,1 M PHEM buffer, at pH 7.2.
- Postfix in a 1% osmium tetroxide, 0.8% ferrocyanide potassium and 5 mM calcium chloride solution for 1 hour.
- Wash cells with 0.1 PHEM buffer.
- Dehydrate cells in graded acetone solutions (50, 70, 90, and two changes in 100% for 10 minutes).
- After dehydration, embedd cells in Epon® resin.
- Cut thin sections on a ultramicrotome.
- Stain ultrathin sections with a saturated solution of uranyl acetate and lead citrate.
- Examine samples at 80 kV accelerating Voltage on a TEM.

Cell cycle analysis

- 1.5×10^5 cancer cells in culture.
- Remove the existing culture medium from the cells and replace with new medium.
- Incubate the cells according to the standard treatment protocol.

- Fix cells in 5 ml of cold 70% ethanol and stored at 4 °C for subsequent cell cycle analysis.
- Wash cells with PBS twice, incubate with 50 µl of RNase A/PBS (100 µg/ml) at 37 °C for 30 min and stain with 200 µl of PI (50 µg/ml) at room temperature in the dark for 15 min.
- Analysis by Flow cytometer.

Western blotting

- Remove the existing culture medium from the cells and replace with new medium.
- Incubate cancer cell line with control or different concentration of bioactive compounds.
- After the induction of apoptosis, scrape cells and collect in 15-ml tube.
- Spin at 250 g for 10 min at 4°C.
- Re-suspend pellet in 6 ml 1× PBS and spin again at 250 g for 10 min at 4 °C to wash.
- Remove as much PBS as possible without disrupting pellet and then add 100 µL lysis buffer with appropriate protease inhibitor.
- Vortex and keep on ice for 20 min vortexing periodically.
- Spin at 1100 g for 15 min at 4 °C and collect supernatant.
- Keep lysates at –40 °C until further use.
- Cell lysates (30 µg/sample) were subjected to electrophoresis on a 10% SDS-PAGE gel.
- Electrotransfer gels onto nitrocelulose membranes.
- Semidry transfer system.
- Block the membranes with 5% nonfat milk at room temperature for 1 h.
- Incubate with primary antibody used at different dilution at 4 °C overnight and after use a horseradish peroxidase (HRP) - conjugated secondary antibody at 1:5000 for 1 h.
- Detect immunoblotting using a chemiluminescent substrate kit.
- Capture the images by a ChemiDoc system.

Caspase activity Assay

- After the induction of apoptosis with bioactive compounds or control, scrape cells and collect in 15-ml tube.
- Spin at 250 g for 10 min at 4 °C.
- Re-suspend pellet in 6 ml 1× PBS and spin again at 250 g for 10 min at 4 °C.
- Homogenized in Buffer containing 25 mM Hepes, 5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 2 mM DTT and 0.1% CHAPS (pH 7.5).
- Centrifuges at 12,000 xg for 10 min (4 °C).
- Total protein (100 µg) from the supernatants.
- Determine activities of caspase-3 using the chromogenic substrates, namely 200 µM Ac-DEVD-pNA, PH 7.5.
- Absorbance at 405 nm determined in a microplate reader after incubation at 37 °C for 1 h.
- Specific activities of caspase-3 (nmol of pNA formed/min/mg) calculated using standard curve of p-nitroaniline (pNA), using 100 µl volume in a 96 well plate using an ELISA reader.

4. REFERENCES

1. Jia M, Chen L, Xin HL, Zheng CJ, Rahman K, Han T, Qin LPA (2016) Friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants. *Front microbiol* 7:907
2. Saikkonen K, Wäli P, Helander M, Faeth SH (2004) Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends Plant Sci* 9(6):275-80.
3. Tan RX, Zou WX (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep* 18(4):448-59
4. Strobel G, Daisy B (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(4):491-502
5. Gouda S, Das G, Sen SK, Shin HS, Patra JK (2016) Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Front Microbiol* 29(7):1538
6. El-Hawary SS, Sayed AM, Rateb ME, Bakeer W, AbouZid SF, Mohammed R (2017) Secondary metabolites from fungal endophytes of *Solanum nigrum*. *Nat Prod Res* 31(21):2568-2571

7. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2(1):48-58
8. Hartwell JL (1982) *Plants used against cancer: A survey*. Quarterman, Lawrence.
9. Kharwar RN, Mishra A, Gond SK, Stierle A, Stierle D (2011) Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Nat Prod Rep* 28(7):1208-28
10. Li SJ, Zhang X, Wang XH, Zhao CQ (2018) Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity. *Eur J Med Chem* 5(156):316-343
11. Chandra H, Kumari P, Prasad R, Gupta SC, Yadav S (2021) Antioxidant and antimicrobial activity displayed by a fungal endophyte *Alternaria alternata* isolated from *Picrorhiza kurroa* from Garhwal Himalayas, India. *Biocatal Agric Biotechnol* 33: 101955
12. Verma VC, Kharwar RN, Strobel GA (2009) Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. *Nat Prod Commun.* 4(11):1511-32
13. Su LJ, Mahabir S, Ellison GL, McGuinn LA, Reid BC (2012) Epigenetic contributions to the relationship between cancer and dietary intake of nutrients, bioactive food components, and environmental toxicants. *Front Genet* 9(2):91
14. Gao H, Li G, Lou HX (2018) Structural Diversity and Biological Activities of Novel Secondary Metabolites from Endophytes. *Molecules* 23: 646-677
15. Cheng-Guang S, DongMeng F, Li Y, Hong Jiang Y (2015) Antiproliferative activity of rosamultic acid with induction associated of apoptosis, cell cycle arrest, inhibition of cell migration and caspase activation in human gastric cancer (SGC-7901) cells. *Phytomedicine* 22: 796–806
16. Darzynkiewicz Z, Gong J, Juan G, Aldert B, Traganos F (1996) Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry* 25:1-13
17. Fox R, Aubert M. Flow Cytometric Detection of Activated Caspase-3 (2008) p 47-56. *Methods in Molecular Biology, Apoptosis and cancer: Methods and Protocols*, edited by Gil Mor and Ayesha B Alvero. Humana Press Inc. 999, Riverview Drive, Suite 208 Totowa, New Jersey 07512
18. Jaroszeski MJ, Radcliff G. *Fundamentals of flow cytometry* (1999). *Mol Biotech.* 11:37-53

19. Hwang SK, Jeong YJ, Chang YC (2020) PDCD4 inhibits lung tumorigenesis by the suppressing p62-Nrf2 signaling pathway and upregulating Keap1 expression. *Am J Cancer Res* 10:424-439
20. Koopman G, Reutelingsperger COM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, van Oers MHJ (1994) Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. *Blood* 84: 1415-142
21. Lacey AJ. *Light microscopy in biology - A practical approach* (1999). 2nd ed Luds, UK
22. Lu H, Cuib W, KLaassena CD (2011) Nrf2 protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced oxidative injury and steatohepatitis. *Toxicol Appl Pharmacol* 256:122–135
23. Maues LAL, Alves GM, Couto NMG, da Silva BJM, Arruda MSP, Macchi BM, Senac CBC, Pradoc AF, Crespo-Lopez ME, Silva EO, do Nascimento JLM (2019) Flavonoids from the Amazon plant *Brosimum acutifolium* induce C6 glioma cell line apoptosis by disrupting mitochondrial membrane potential and reducing AKT phosphorylation. *Biomed Pharmacother* 113:1.08728
24. McCarthy N and Evan G (1998) Methods for Detecting and Quantifying Apoptosis. *Curr Top Dev Biol* 36: 258-278
25. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* 65: 55–63
26. Obeng E (2021) Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review *Braz J Biol* 81: 1133-1143
27. Opas M (1999) Fluorescence tracing of intracellular proteins. *Biotech Histochem* 74:294-310
28. Pardee ABG (1989) Events and regulation of cell proliferation. *Science* 246: 603-608
29. Telford WG, King LE, Fraker PJ (1994) Rapid quantification of apoptosis in pure and heterogeneous cell populations using flow cytometry. *J Immunol Methods* 172: 1-16

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro estudo a explorar fungos endofíticos das folhas de *Buchenavia tomentosa* e avaliar suas potenciais atividades antimicrobianas *in vitro*. Os resultados demonstraram que o endofítico FC12 e FC31 mostraram-se eficazes contra todos os três patógenos bacterianos em estudo, sendo a concentração inibitória mínima observada de 25 µg/ml por pelo menos um endofítico em todos os patógenos. O fungo FC123 foi capaz de inibir o crescimento do fitopatógeno *Rhizopus stolonifer* em mais de 50% pela difusão de substâncias. Portanto, os isolados endofíticos descritos constituem potenciais fontes atrativas de fármacos. As confirmações poderão ser feitas após a verificação dos níveis de citotoxicidade e das caracterizações químicas.

O tratamento com o extrato liofilizado de *E. plicata* mostrou efeito citotóxico e atividade antiproliferativa em células de glioma e induziu a morte celular por mecanismo de produção de EROS, sem causar hemólise. As frações derivadas deste extrato também influenciaram a viabilidade celular de C6, com destaque para a fração hexânica. Assim, a molécula de eleuterina foi identificada como o principal composto relacionado à indução de morte celular observada nesta linhagem tumoral.

Portanto, os resultados sugerem que o extrato de *E. plicata* pode conter um potencial inibidor de células de glioma. Vários estudos apontam para o papel essencial da investigação de compostos e derivados naturais como fármacos e adjuvantes na abordagem farmacológica de diferentes tipos de tumores. Assim, abre-se a possibilidade da molécula de eleuterina como uma opção viável de tratamento do câncer, em que novos estudos e testes em modelo *in vivo* são de extrema importância clínica e científica.

4. PERSPECTIVAS FUTURAS

A planta *Buchenavia tomentosa* (Capítulo I) possui poucas informações na literatura científica, sendo este o primeiro trabalho desenvolvido com fungos endofíticos isolados de suas folhas. Dada a relevância na área de antimicrobianos, pois inibiu duas bactérias consideradas emergentes pela OMS quanto à resistência bacteriana, e o desenvolvimento de novos antimicrobianos, aponta-se algumas possibilidades de desenvolvimento futuro:

- Caracterização química dos extratos vegetais e fúngicos, para investigação da (s) substâncias químicas envolvidas;
- Verificação dos níveis de citotoxicidade dessas substâncias;
- Isolamento da (s) substâncias inibidoras envolvidas;
- Verificação da produção dessas substâncias pelos endofíticos;
- Identificação molecular dos micro-organismos isolados.

Os resultados do Capítulo II, envolvendo a planta *Eleutherine plicata*, demonstram a possibilidade da molécula eleuterina como uma opção viável de tratamento do câncer. Tratando-se de testes *in vitro*, sugere-se a experimentação em modelo *in vivo* para uma investigação clínica e científica mais aprofundada. Outra possibilidade de desenvolvimento futuro seria como esta molécula poderia ser apresentada como medicamento.

No Capítulo III é sugerido um método para verificação das substâncias anticancerígenas pelos fungos endofíticos conforme identificação na planta hospedeira. Já foram isolados 39 fungos endofíticos da *Eleutherina plicata* e os extratos fúngicos foram obtidos após crescimento em caldo BDA por 14 dias, utilizando hexano como extrator. Os extratos estão prontos para processamento em aparelhos de cromatografia e a perspectiva é que se encontrada a molécula eleuterina por algum fungo, o mesmo seja identificado molecularmente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAAM, E.P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, v. 146, p. 837, 1940.
- ABDELRAZEK, N. A.; ELKHATIB, W. F.; RAAFAT, M. M.; ABOULWAFI, M. M. Production, characterization and bioinformatics analysis of L-asparaginase from a new *Stenotrophomonas maltophilia* EMCC2297 soil isolate. **AMB Express**, v. 10, p. 71, 2020.
- ALDRED, K. J.; SCHWANZ, H. A.; LI, G.; MCPHERSON, S. A.; TURNBOUGH, C. L. JR, KERNS, R. J.; OSHEROFF, N. Overcoming Target-Mediated Quinolone Resistance in Topoisomerase IV by Introducing Metal Ion-Independent Drug- Enzyme Interactions. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 12, p. 2660–2668, 2013.
- ALY, A. H.; DEBBAD, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.
- ALVARADO, M.; CLEMENTE-CASARES, P.; MORENO, D. A.; DE GROOT, P. W. J. MicroMundo Upside Down: Targeted Searching for Antibiotics Producing Bacteria from Soil with Reverse Antibiosis Approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 577550, 2020.
- ALVIN, A.; MILLER, K. I.; NEILAN, B. A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants sources of antimycobacterial compounds. **Microbiological Research**, v. 169, n. 7-8, p. 483-495, 2014.
- ANDREOZZI, A.; PRIETO, P.; MERCADO-BLANCO, J.; MONACO, S.; ZAMPIERI, E; ROMANO, S.; VALÈ, G.; DEFEZ, R.; BIANCO, C. Efficient colonization of the endophytes *Herbaspirillum huttiense* RCA24 and *Enterobacter cloacae* RCA25 influences the physiological parameters of *Oryza sativa* L. cv. Baldo rice. **Environmental microbiology**, v. 21, n. 9, p. 3489-3504, 2019.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2007. **Antimicrobianos – bases teóricas e uso clínico**. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/lactamicos.htm. Acesso em 30 de agosto de 2022.
- ARORA, P.; WANIZ, A.; AHMAD, T.; SULTAN, P.; GUPTA, S.; RIYAZ-UL-HASSAN, S. Community structure, spatial distribution, diversity and functional characterization of culturable endophytic fungi associated with *Glycyrrhiza glabra* L. **Fungal Biology**, v. 123, p. 373–383, 2019.
- ARRUDA, C. J. M.; SIQUEIRA, V. F. A.; SOUZA, F. J. M; SILVA, J. L. N.; SANTOS, K; F.; CIPRIANO, D. Z.; DIAS, L. A. S.; FARO, F. R. A. Revisão bibliográfica de antibióticos beta-lactâmicos. **Revista Saúde em Foco**, n. 11, p. 982-995, 2019.

AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. Cancer chemoprevention. *In*: AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. **Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs**. 1ª edition, Elsevier, 2008. p. 417–429.

AZEVEDO, M. I. R.; PAIVA, H. N. E GOMES, J. M. Efeitos de substratos, luz e temperatura na germinação de sementes da espécie *Buchenavia tomentosa* Eichler (mirindiba) em condições de laboratório. **Agri-Environmental Science**, vol. 1, n. 1, p. 11-22, 2014.

BATISTA, A. L. Avaliação da atividade antimicrobiana e antiradicalar dos extratos e substâncias dos frutos de *Buchenavia tomentosa* – Eichler (Combretaceae) e *Ouratea spectabilis* Aubl. (Ochnaceae). Campo Grande; 2011. [Tese – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

BELLINCONTRO, A., CATELLI, C., COTARELLA, R.; MENCARELLI, F. Postharvest ozone fumigation of Petit Verdot grapes to prevent the use of sulfites and to increase anthocyanin in wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 23, n. 2, p. 200-206, 2017.

BRANDAO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Chemistry and pharmacology of antineoplastic chemoterapeutical derivatives from plants. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BHANOT, A.; SHARMA, R.; NOOLVI, M. N. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, n. 1, p. 09–26, 2011.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS - RENISUS. Brasília: DF, 2009. Acesso em: 20 abr. 2019.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BRIGHENTI, F. L.; SALVADOR, M. J.; GONTIJO, A. V. L.; DELBEM, A. C. B.; DELBEM, Á. C. B.; SOARES, C. P.; OLIVEIRA, M. A. C.; GIRONDI, C. M.; KOGA-ITO, C. Y. Plant extracts: initial screening, identification of bioactive compounds and effects against *Candida albicans* biofilms. **Future Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 15-27, 2017.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, p. 2157-2184, 2004.

CALDERANI, F. A.; ORLANDELLI, R. C.; PAMPHILE, J. A. Compostos bioativos com propriedades antitumorais produzidos por fungos endofíticos. **Revista UNINGÁ Review**, v. 25, n. 2, p. 79-86, 2016.

CAMPOS, A.; VENDRAMINI-COSTA, D.B.; FIORITO, G.F.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; SOUZA, G.M.R.; DELLE-MONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V.

Antiproliferative effect of extracts and pyranonaphthoquinones obtained from *Cipura paludosa* bulbs. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, p. 1022–1026, 2016.

CASTELLANI, A. Maintenance and Cultivation of Common Pathogenic Fungi of Man in Sterile Distilled Water. Further Researcher. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 181-184, 1967.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, v. 88, p. 26–40, 2020.

CHRISTENSEN, M. J.; BENNETT, R. J.; SCHMID, J. Growth of *Epichloë/Neotyphodium*, and p-endophytes in leaves of *Lolium* and *Festuca* grasses. **Mycological Research**, v. 106, n. 1, p. 93-106, 2002.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v.126, p.159–175, 2009.

COSTA, F. G. C; NUNES, F. C. P.; PERES, V. Mapeamento etnofarmacológico e etnobotânico de espécies de cerrado, na microrregião de Patos de Minas. **UNIPAM**, v. 2, n. 7, p. 93-111, 2010.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47–58, 2010.

COSTA, A. M. D.; SOUZA, D. P. M.; CAVALCANTE, T. V.; ARAÚJO, V. L.; RAMOS, A. T.; MARUO, V. M. Toxic plants of animal interest in an Amazonian and cerrado ecotone region Part II. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 3, p. 317-324, 2011.

COUTO CLL, MORAES DFC, CARTÁGENES M, DO SS et al. *Eleutherine bulbous* (Mill.) Urb.: A review study. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, p. 286–297, 2016.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, v.77, n.1, p.7-24, 2005.

CROTEAU, R.; KETCHUM, R. E.; LONG, R. M.; KASPERA, R.; WILDUNG, M.R. Taxol biosynthesis and molecular genetics. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 1, p. 75–97, 2006.

DAI, J. J. , MIN, Q. X. , ZHONG, C. H. , & WANG, H. X. Protective effect and antioxidant effect of red onions on acute gastric mucosal injury. **The Chinese Journal of Clinical Pharmacology**, v. 6, p. 89–91, 2013.

DE ALMEIDA, V. L. D.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular

específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

DOMAGALA, J. M. and S. E. HAGEN. 2003. **Structure-activity relationships of the quinolone antibacterials in the new millennium: some things change and some do not**. In: Quinolone Antimicrobial Agents. 3rd ed. D.C. Hooper & E. Rubinstein, Eds.: 3–18. Washington, DC: ASM Press, 2003.

DROLET, M. DNA Topoisomerases Methods and Protocols Methods in Molecular Biology 1703. [s.l: s.n.].

DUKARE, A. S. et al. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 9, p. 1498-1513, 2019.

EVIDENTE, A.; KORNIENKO, A.; CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; LEFRANC, F.; MATHIEU, V.; KISS, R. Fungal metabolites with anticancer activity. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 617–627, 2014.

EYBERGER, A. L.; DONDAPATI, R.; PORTER, J. R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1121–1124, 2006.

FARIA, L. F.; GODOI, L. B. F.; ROMANO, L. H. Principais mecanismos de resistência bacteriana relacionados ao uso indiscriminado de antibióticos. **Revista Saúde em Foco**, v. 13, p. 576 - 587, 2021.

FERREIRA, B. L. S.; OLIVEIRA, T. C. D. Resistência bacteriana e sua relação com o consumo incorreto de antibióticos. **Revista Multidisciplinar Em Saúde**, v. 2, n. 2, p. 48, 2021.

FERREIRA, M. D. S.; MOURA, E. R.; BATISTA, E. K. F.; SILVA, S. M. M. S.; CARDOSO, F. C. F. O.; BATISTA, M. C. S. Evaluation of the reproductive toxic potential of *Buchenavia* sp. fruit extract in male impersonal wistar rats. **Archives of Veterinary Science**, v. 21, n. 2, p. 79-86, 2016.

FYHRQUIST P.; MWASUMBI L.; HÆGGSTRÖM C. A. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania . *J. Ethnopharmacol.* 79 (2), 169 - 177 (2002).

GARCIA, J. V. A. S.; COMARELLA, L. O uso indiscriminado de antibióticos e as resistências bacterianas. **Caderno Saúde e Desenvolvimento**, v. 10, n. 18, p. 9, 2021.

GARRAWAY, L. A.; JANNE, P. A. Circumventing Cancer Drug Resistance in the Era of Personalized Medicine. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 3, p. 214–226, 2012.

GERMAINE, K.; KEOGH, E.; GARCIA-CABELLOS, G.; BORREMANS, B.; LELIE, D. BARAC, T.; OEYEN, L.; VANGRONVELD, J.; MOORE, F. P.; MOORE, E. R. B.; CAMPBELL, C. D.; RYAN, D.; DOWLING, D. N. Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, n. 1, p. 109–118, 2004.

GILL, H.; VASUNDHARA, M. Isolation of taxol producing endophytic fungus *Alternaria brassicicola* from non-Taxus medicinal plant *Terminalia arjuna*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 74, 2019.

GIRONDI, C. M.; OLIVEIRA, A. B.; PRADO, J. A.; KOGA-ITO, C. Y.; BORGES, A. C.; DELBEM, A. C. B.; PEREIRA, D. F. A.; SALVADOR, M. J.; BRIGHENTI, F. L. Screening of plants with antimicrobial activity against enterobacteria, *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus* spp. **Future Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 671-681, 2017.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 1, p. 48-58, 2002.

GOUDA, S.; DAS, G.; SEN, S. K.; SHIN, H. S.; PATRA, J. K. Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1538, 2016.

HERRE, E. A.; KNOWLTON, N.; MUELLER, U. G.; REHNER, S. A. The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 2, p. 49-53, 1999.

HIGGINBOTHAM, S. J.; ARNOLD, A. E.; IBANEZ, A.; SPADAFORA, C.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Bioactivity of fungal endophytes as a function of endophytes taxonomy and the taxonomy and distribution of their host plants. **PloS One**, v. 8, n. 9, p. e73192, 2013.

HU, X. L., CHU, L., DONG, X., CHEN, G. R., TANG, T., CHEN, D., ... and TIAN, H. Multivalent Glycosheets for Double Light-Driven Therapy of Multidrug-Resistant Bacteria on Wounds. **Advanced Functional Materials**, v. 29, n. 14, p. 1806986, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INSTITUTO ONCOGUIA. **O que é câncer**. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/cancer/12/1/>>. Acesso em: 20 out. 2019.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Tratamentos do câncer**. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamentos/77/50/?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=oncoguia_search&utm_term=cancer_tratamentos&gclid=Cj0KCQjw_ez2BRCyARIsAJfg-kuFj_cC-SxhzCn1a4e5jPdySuijrvUdqFOpIa36pHW73t5y4w4j6_oaAgzdEALw_wcB>. Acesso em: 06 jun. 2020.

INDEX FUNGORUM. 2014. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/namesrecord.asp?RecordID=119545>. Acesso em 14 de set de 2022.

JAFRI, L.; SALEEM, S.; KONDRYTUK, T. P.; HAQ, I.; ULLAH, N.; PEZZUTO, J. M. E MIRZA, B. *Hedera nepalensis* K. Koch: A Novel Source of Natural Cancer

Chemopreventive and Anticancerous Compounds. **Phytotherapy research**, v. 30, n. 3, p. 447-453, 2015.

JIA, M.; CHEN, L.; XIN, H. L.; ZHENG, C. J.; RAHMAN, K.; HAN, T.; QIN, L. P. A. Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants. **Journal Frontier's in Microbiology**, v. 7, p. 907, 2016.

KASAEI, A.; DEHKORDI, M. M.; MAHJoubI, F.; SAFFAR, B. Isolation of Taxol-Producing Endophytic Fungi from Iranian Yew Through Novel Molecular Approach and Their Effects on Human Breast Cancer Cell Line. **Current Microbiology**, v. 62, p. 164–709, 2017.

KATOCH, M.; PHULL, S.; VAID, S.; SINGH, S. Diversity, Phylogeny, anticancer and antimicrobial potential of fungal endophytes associated with *Monarda citriodora* L. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 44, 2017.

KHAN, A. R.; WAQAS, M.; ULLAH, I.; KHAN, A. L.; KHAN, M. A.; LEE, I. J.; SHIN, J. H. Culturable endophytic fungal diversity in the cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their role in enhancing phytoremediation. **Environmental and Experimental Botany**, v. 135, p. 126-135, 2017.

KIRBY, W.M.M. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant *staphylococci*. **Science**, v. 99, p. 452-453, 1944.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, J. R. W. C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2018.

LASTOCHKINA, Oksana et al. *Bacillus* spp.: efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Plants**, v. 8, n. 4, p. 97, 2019.

LATZ, M. A.; JENSEN, B.; COLLINGE, D. B.; JØRGENSEN, H. J. Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. **Plant Ecology & Diversity**, v. 11, n. 5-6, p. 555-567, 2018.

LEE, S.; XIAO, C.; PEI, S. Ethnobotanical survey of medicinal plants at periodic markets of Honghe Prefecture in Yunnan Province, SW China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 362–377, 2008.

LESHER, G. Y.; E. D. FORELICH; M. D. GRUET; ET AL. 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. **Journal of medicinal and pharmaceutical chemistry**, v. 5, p. 1063– 1068, 1962.

LEYLAIE S, ZAFARI D. Antiproliferative and antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of endophytic *Trichoderma* species from *Vinca* plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1484, 2018.

LIMA, T. B. Desenvolvimento de novas terapias no combate a linhagens de *Enterobacter cloacae* resistentes à colistina. 2013. 170f. Tese de Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2013.

LORENZI, H. **Brazilian Trees: manual of identification and cultivation of tree plants of Brazil**. 3 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MALHEIROS, L. C. D. S.; MELLO, J. C.; BARBOSA, W. L. R. *Eleutherine plicata* – quinones and antioxidant activity. **InTech**, v. 14, p. 323–338, 2015.

MANGANYI, M. C.; ATEBA, C. N. Untapped potentials of endophytic fungi: A review of novel bioactive compounds with biological applications. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1934, 2020.

MARINHO, L. S. S.; PAZ, F. A. N. Consequências do uso indiscriminado de medicamentos como prevenção do COVID-19: revisão integrativa. **RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar**, v. 2, n. 10, p. e210886-e210886, 2021.

MEDINA, M.; LEGIDO-QUIGLEY, H.; HSU, L.Y. **Antimicrobial Resistance in One Health**. In: MASYS, A.J. et al. (eds). *Global Health Security*. Springer Nature Switzerland AG, p. 209–229, 2020.

MELLO, G. W. S.; OLIVEIRA, D. M.; CARVALHO, C. J. S.; PIRES, L. V.; COSTA, F. A. L.; RIET-CORREA, F.; SILVA, S. M. M. Toxic plants for ruminants and equidae in northern Piauí. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 1-9, 2010.

MENA, P.; LLORACH, R. New frontiers on the metabolism, bioavailability and health effects of phenolic compounds. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 151, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Câncer: sintomas, causas, tipos e tratamentos. Disponível em: < <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer>>. Acesso em: 06 jun. 2020.

MONTELLI, A.C.; SADATSUNE, T. **Antibioticoterapia para o clínico**. Sociedade Brasileira de Microbiologia. Rio de Janeiro, p. 7, 2001.

MOYAERT, H.; DE JONG, A.; SIMJEE, S.; et al. Survey of antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from dogs and cats with respiratory tract infections in Europe: ComPath results. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, p. 29-46, 2019.

MOJZER, E. B.; HRNČIČ, M. K.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Ž.; BREN, U. Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 901, 2016.

NAKANO, V.; NISHIYAMA, S. A.; AVILA-CAMPOS, M. J. **Beta-lactamases: Sua importância na resistência bacteriana**. Departamento de Microbiologia, Laboratório de Anaeróbios – Universidade Federal de São Paulo – USP. Disponível em: http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=57. Acesso em: 26/08/22.

NUNES, C. A. Biological control of postharvest diseases of fruit. **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, n. 1, p. 181-196, 2012.

OLIVEIRA NETO, A. R.; PINTO, M. A.; SILVA, I. R.; MORAES, S. C.; GOMES, M. L. O uso de *Eleutherine plicata* no tratamento de doenças gastrointestinais na Amazônia paraense. In: Congresso de Ecologia do Brasil, 2007, Caxambu – MG. **Anais...** Caxambu – MG, 2007.

PETIT, C.; OSWALD, E.; NOUGAYREDE, J. P. Role des genotoxines produites par des bacteries du microbiote dans le cancer colorectal. **Revue Francophone des Laboratoires**, v. 456, p. 77-82, 2013.

PINTO, W S; ROSA L H ; SILVA, J. F. M. PIMENTA, R. S.. Diversity and antimicrobial activities of endophytic fungi of *Myrcia sellowiana* (Myrtaceae) from Tocantins. **Acta Horticulturae**, v. 905, p. 283-286, 2011.

RIBEIRO, R. V.; BIESKI, I. G. C.; BALOGUN, S. O.; MARTINS, D. T. O. Ethnobotanical study of medicinal plants used by ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 205, 69-102, 2017.

RAHMATULLAH, M.; HOSSAN, S.; HANIF, A.; ROY, P.; JAHAN, R.; KHAN, M.; CHOWDHURY, M. H.; RAHMAN, T. Ethnomedicinal Applications of Plants by the Traditional Healers of the Marma Tribe of Naikhongchhari, Bandarban District, Bangladesh. **Advances in Natural and Applied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 392-401, 2009.

RAHMATULLAH, M.; RAHMAN, T.; JAHAN, R. Anti-malarial plants used in folk medicine in Bangladesh. In: RAI, M. K.; CORDELL, G. A.; MARTINEZ, J. L.; MARINOFF, M. L. R. **Medicinal Plants: Biodiversity and Drugs**, 1st edn. CRC Press, p. 241–290, 2012

RAN, X.; ZHANG, G.; LI, S.; WANG, J. Characterization and antitumor activity of camptothecin from endophytic fungus *Fusarium solani* isolated from *Camptotheca acuminata*. **African Health Sciences**, v. 17, p. 566–574, 2017.

ROCHE, V. F. Cancer and chemotherapy. In: **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 7. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 1199–1266.

SHARMA, P.; KUMAR, S. Bioremediation of heavy metals from industrial effluents by endophytes and their metabolic activity: Recent advances. **Bioresource Technology**, v. 339, 125589, 2021.

SHARMA, V.; KAUR, H.; KUMAR, T.; MISHRA, T. Traditional Indian herb *Cathranthus roseus* used as cancer treatment: a review. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 8, p. 1926–1928, 2016.

SHEN, F. T.; YEN, J. H.; LIAO, C. S.; CHEN, W. C.; CHAO, Y. T. Screening of rice endophytic biofertilizers with fungicide tolerance and plant growth-promoting characteristics. **Sustainability**, v. 11, n. 4, p. 1133, 2019.

SCHUEFFLER, A.; ANKE, T. Fungal natural products in research and development. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 1425-1448, 2014.

SILVA, M. A. B.; MELO, L. V. L.; RIBEIRO, R. V.; SOUZA, J. P. M.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SILVA, R. M. Ethnobotanical survey of plants used as antihyperlipidemic and anorexigenic by the population of Nova Xavantina-MT, Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 549-562, 2010a.

SIMÕES, C. M. O. et al. (org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. ed. rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2001.

STIERLE, A.; STROBEL, G. A.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

SUN, D. X.; ZHAO, D.; WEI, H. Y.; MA, X. L.; SHI, L.L.; ZHANG, J. Four New Sesquiterpenoids from the Roots of *Diarthron Tianschanica* with Their Antineoplastic Activity. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1383, 2018.

TAN, X. M.; ZHOU, Y. Q.; ZHOU, X. L.; XIA, X. H.; WEI, Y.; HE, L. L.; TANG, H. Z.; YU, L. Y. Diversity and bioactive potential of culturable fungal endophytes of *Dyosma versipellis*; a rare medicinal plant endemic to China. **Scientific Reports**, v. 8, p. 5929, 2018.

TEIXEIRA, T. S.; VALE, R. C.; ALMEIDA, R. R., FERREIRA, T. P. S.; GUIMARÃES, L. G. L. Antioxidant potential and its correlation with the contents of phenolic compounds and flavonoids of methanolic extracts from different medicinal plants. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 4, p. 1546-1559, 2017.

TEODORO, G. R.; BRIGHENTI, F. L.; DELBEM, A. C.; DELBEM, Á. C.; KHOURI, S.; GONTIJO, A. V.; PASCOAL, A. C.; SALVADOR, M. J.; KOGA-ITO, C. Y. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. **Future Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 917-927, 2015.

TEODORO, G. R.; GONTIJO, A. V. L.; SALVADOR, M. J.; TANAKA, M. H.; BRIGHENTI, F. L.; DELBEM, A. C. B.; DELBEM, A. C. B.; KOGA-ITO, C. Effects of acetone fraction from *Buchenavia tomentosa* aqueous extract and gallic acid on *Candida albicans* biofilms and virulence factors. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 647, 2018.

UENO, B. Podridão-mole (*Rhizopus stolonifer*). UZUM Pêssego - Sistema especialista para diagnóstico de doenças, pragas e distúrbios fisiológicos em pessegueiros. Embrapa. Disponível em: https://www.cnpuv.embrapa.br/uzum/pessego/pod_mole.html. Acesso em: 09 de set. de 2022.

VALE, V.V., CRUZ, J.N., VIANA, G.M.R.; PÓVOA, M. M.; BRASIL, D. S. B.; DOLABELA, M. F. Naphthoquinones isolated from *Eleutherine plicata* herb: in vitro antimalarial activity and molecular modeling to investigate their binding modes. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, p. 487-494, 2020.

VAN HOUTEN, C. B., OVED, K., EDEN, E., COHEN, A., ENGELHARD, D., BOERS, S., ... AND BONT, L. J. Observational multi-centre, prospective study to characterize novel pathogen-and host-related factors in hospitalized patients with lower respiratory

tract infections and/or sepsis-the “TAILORED-Treatment” study. **BMC infectious diseases**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2018.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R. J.; SAND, C.; RENNIE, R. P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of ethnopharmacology**, v. 115, n. 1, p. 140-146, 2008.

WILLIAMS, J. D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. International. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, p. 3-7, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tenth Revision. *In: International statistical classification of diseases and related health problems* vol. 2. Ed. Geneva, Switzerland: WHO, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. 2017. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> Acesso em 30 de agosto de 2022.

WU, C. P.; HSIEH, C. H.; WU, Y. S. The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 6, p. 1996–2011, 2011.

YADAV, A. N. Biodiversity and biotechnological applications of host-specific endophytic fungi for sustainable agriculture and allied sectors. **Acta Sci Microbiol**, v. 1, n. 5, p. 01-05, 2018.

YANG, M. H.; LI, T. X.; WANG, Y.; LIU, R. H.; LUO, J.; KONG, L. Y. Antimicrobial metabolites from the plant endophytic fungus *Penicillium* sp. **Fitoterapia**, v. 116, p. 72–76, 2017.

ZHOU, L.; ZHANG, Z.; WEI, M.; XIE, Y.; HE, S.; SHI, H.; LIN, Z. Evaluation of the antifungal activity of individual and combined monoterpenes against *Rhizopus stolonifer* and *Absidia coerulea*. **Environmental Science and Pollution Research**, n. 26, p. 7804-7809, 2019.

ANEXOS

ANEXO I – Certificado de apresentação em evento.



III ETM
ENCONTRO TOCANTINENSE
DAS ESCOLAS MÉDICAS

27 E 28 DE NOVEMBRO
ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DO
ESTADO DO TOCANTINS
PALMAS-TO

A Comissão Organizadora, no uso de suas atribuições, certifica que o trabalho intitulado **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PLANTA *Eleutherine plicata* ("MARUPAZINHO") FRENTE À PATÓGENOS GASTROINTESTINAIS** de autoria de **Pedro Wallace Paiva Silva; Drielly Dayanne Monteiro dos Santos Baliza; Juliana Fonseca Moreira da Silva; Raphael Sanzio Pimenta** orientado por **Eskalath Morganna Silva Ferreira**, foi apresentado na modalidade **PÓSTER** durante o **III Encontro Tocantinense das Escolas Médicas**, realizado no dias 27 e 28 novembro de 2020, no Conselho Regional de Medicina do estado do Tocantins.

Palmas, 28 de novembro de 2020
7 de dezembro de 2020

Antonio Oliveira dos Santos Junior
Antonio Oliveira dos Santos Junior
Coordenador Docente

Guilherme Assunção Godinho
Guilherme Assunção Godinho
Presidente do III Encontro Tocantinense
das Escolas Médicas

Artur Marques Manno
Artur Marques Manno
Coordenador Discente da Comissão
Científica

CERTIFICADO

Autenticação
web.eventogyn.com.br/event/etm2020/certificacao
Código de Segurança: 651.113.698.198

APOIO INSTITUCIONAL



ANEXO II – Certificado de premiação.



III ETM
ENCONTRO TOCANTINENSE
DAS ESCOLAS MÉDICAS

27 E 28 DE NOVEMBRO
ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DO
ESTADO DO TOCANTINS
PALMAS-TO

A Comissão Organizadora, no uso de suas atribuições, certifica que o trabalho intitulado **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PLANTA *Eleutherine plicata* ("MARUPAZINHO") FRENTE A PATÓGENOS GASTROINTESTINAIS** de autoria de **Pedro Wallace Paiva Silva; Drielly Dayanne Monteiro dos Santos Baliza; Juliana Fonseca Moreira da Silva; Raphael Sanzio Pimenta** foi apresentado e classificado em **1º Lugar** durante o III Encontro Tocantinense das Escolas Médicas, realizado no dias 27 e 28 novembro de 2020, no Conselho Regional de Medicina do estado do Tocantins.

Antônio O. S. J.
Antônio Oliveira dos Santos Junior
Coordenador Docente

Palmas, 28 de novembro de 2020
Emitido em: 6 de fevereiro de 2021

Guilherme Assunção Godinho
Guilherme Assunção Godinho
Presidente do III Encontro Tocantinense das
Escolas Médicas

Hyágo Phernando N. Arruda
Hyágo Phernando Nôleto Arruda
Vice-Presidente do III Encontro Tocantinense
das Escolas Médicas

APOIO INSTITUCIONAL



Autenticação
web.eventogyn.com.br/event/etm2020/certificac
Código de Segurança: 651.113.698.198

CERTIFICADO

ANEXO III – Certificado de apresentação em evento.

IVETEM
ENCONTRO TOCANTINENSE
DAS ESCOLAS MÉDICAS

Medicina e Inovação: a tecnologia como aliada à saúde
19 E 20 DE NOVEMBRO DE 2021

A Comissão Organizadora, no uso de suas atribuições, certifica que o trabalho intitulado **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS FÚNGICOS DA PLANTA Buchenavia tomentosa (MIRINDIBA) FRENTE À PATÓGENOS HUMANOS** de autoria de Pedro Wallace Paiva Silva; Drielly Monteiro dos Santos Baliza; Raphael Sanzio Pimenta; Eduardo Araujo da Silva; Juliana Fonseca Moreira da Silva orientado por Eskálath Morganna Silva Ferreira, foi apresentado na modalidade PÔSTER durante o **IV Encontro Tocantinense das Escolas Médicas**, realizado nos dias 19 e 20 novembro de 2021, na ITPAC palmas.

Palmas, 20 de novembro de 2021
Emitido em: 20 de dezembro de 2021

Artur M. Manno
Artur Marques Manno
Presidente do III Encontro Tocantinense
das Escolas Médicas

Giovanna Lyssa de Melo Rosa
Giovanna Lyssa de Melo Rosa
Coordenador Discente da
Comissão Científica

Autenticação
web.eventogyn.com.br/event/etem2021/certificate
Código de Segurança: 854.652.196.635

APOIO INSTITUCIONAL

UnirG ITPAC UNITPAC

CERTIFICADO

ANEXO IV – Artigo “Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à Mirindiba, *Buchenavia tomentosa* (Combretaceae)” publicado na Revista interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À MIRINDIBA, *Buchenavia tomentosa* (Combretaceae)

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ENDOPHYTIC FUNGI ASSOCIATED WITH MIRINDIBA, *BUCHENAVIA TOMENTOSA* (COMBRETACEAE)

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE HONGOS ENDOFÍTICOS ASOCIADOS A MIRINDIBA, *BUCHENAVIA TOMENTOSA* (COMBRETACEAE)

Drielly Dayanne Monteiro dos Santos Baliza^{*1}, Pedro Wallace Paiva Silva², Geovanka Marcelle Aguiar Leão³, Ernane Gerre Pereira Bastos⁴, Juliana Fonseca Moreira da Silva³, Raphael Sanzio Pimenta¹

¹Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Região Norte, Universidade Federal do Tocantins, Palmas - TO, Brasil.

²Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Curso de Medicina, Universidade Federal do Tocantins, Palmas - TO, Brasil.

³Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins, Palmas - TO, Brasil.

⁴Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Curso de Biomedicina, Universidade Luterana do Brasil, Palmas - TO, Brasil.

*Correspondência: Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Universidade Federal do Tocantins, Av. NS 15, 109 Norte, Palmas, Tocantins, Brasil. CEP:77.001-090. e-mail drielly.dayanne@gmail.com.

Artigo recebido em 21/02/2022 aprovado em 30/09/2022 publicado em 28/02/2023.

RESUMO

Os fungos endofíticos vivem em simbiose com a planta hospedeira, sendo que muitos podem apresentar a capacidade de produzir os mesmos metabólitos ativos que seus hospedeiros, tornando-se um reservatório de uma infinidade de produtos naturais. Esta pesquisa investigou a planta Mirindiba (*Buchenavia tomentosa*) e a atividade antimicrobiana exercida pela planta e por fungos endofíticos isolados de suas folhas. Extratos aquosos da Planta e dos fungos foram testados contra bactérias e um fungo filamentosos, sendo que os extratos do vegetal e dos fungos apresentaram inibição das seguintes bactérias patogênicas: *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis* e *Shigella flexneri* e do fungo fitopatogênico *Rhizopus stolonifer*, demonstrando seu potencial biotecnológico como produtores de substâncias antimicrobianas. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos fungos que apresentaram propriedades antimicrobianas foram determinadas. Dois fungos (FC12 e FC31) inibiram as 3 bactérias testadas. Todas as bactérias foram inibidas por pelo menos um fungo na concentração de 25 µg/ml. Uma atividade antifúngica também foi observada pela difusão de substâncias produzidas pelo isolado (FC123), que inibiu em 53% o crescimento de *Rhizopus stolonifer*, causador da podridão

mole em frutos. Este é o primeiro relato de isolamento e avaliação das propriedades antimicrobianas de fungos endofíticos da *B. tomentosa*.

Palavras-chave: Antimicrobiano, endofíticos, mirindiba.

ABSTRACT

Endophytic fungi live in symbiosis with the host plant, and many can produce the same active metabolites as their hosts, becoming a reservoir for a multitude of natural products. The present study investigated the plant Mirindiba (Buchenavia tomentosa) and the antimicrobial activity exerted by the plant and endophytic fungi isolated from its leaves. Aqueous extracts of the plant and fungi, which were tested against bacteria and a filamentous fungus, inhibited the following pathogenic bacteria: Salmonella Typhimurium, Staphylococcus epidermidis and Shigella flexneri and the phytopathogenic fungus Rhizopus stolonifer, demonstrating their biotechnological potential as producers of antimicrobial substances. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the fungi displaying antimicrobial properties were determined. Two fungi (FC12 and FC31) inhibited the 3 bacteria tested. All the bacteria were inhibited by at least one fungus at a concentration of 25 µg/ml. Antifungal activity was also observed by the diffusion of substances produced by the isolate (FC123), which resulted in 53% growth inhibition of Rhizopus stolonifer, the causative agent of soft rot in fruits. This is the first report on the isolation and assessment of the antimicrobial properties of endophytic fungi from B. tomentosa.

Keywords: Antimicrobial, endophytic, mirindiba.

RESUMEN

Los hongos endófitos viven en simbiosis con la planta hospedante, y muchos tienen la capacidad de producir los mismos metabolitos activos que sus hospedantes, convirtiéndose en reservorio de una multitud de productos naturales. Este estudio investigó la planta Mirindiba (Buchenavia tomentosa) y la actividad antimicrobiana ejercida por la planta y hongos endófitos aislados de sus hojas. Extractos acuosos de la planta y de los hongos fueron probados contra bacterias y un hongo filamentoso, y los extractos de la planta y de los hongos mostraron inhibición de las siguientes bacterias patógenas: Salmonella Typhimurium, Staphylococcus epidermidis y Shigella flexneri y del hongo fitopatógeno Rhizopus stolonifer, demostrando su potencial biotecnológico como productores de sustancias antimicrobianas. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) de los hongos que mostraron propiedades antimicrobianas fueron determinadas. Dos hongos (FC12 y FC31) inhibieron las 3 bacterias probadas. Todas las bacterias fueron inhibidas por al menos un hongo a una concentración de 25 µg/ml. Actividad antifúngica también fue observada por la difusión de sustancias producidas por el aislado (FC123), que inhibió en un 53% el crecimiento de Rhizopus stolonifer, causante de la pudrición blanda en frutos. Este es el primer reporte de aislamiento y evaluación de las propiedades antimicrobianas de hongos endófitos de B. tomentosa.

Descriptor: Antimicrobiano, endófito, mirindiba.

INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade as plantas despertam interesse como fontes viáveis e promissoras de frações terapêuticas (RAO e HARIPRASAD, 2021). É de conhecimento que o início do seu uso ou de

seus extratos foi instintivo, através da manipulação pelas pessoas em seu meio ambiente para curar doenças ou desconfortos (ALAMGIR, 2017). No entanto, muitas plantas ainda são desconhecidas ou seu uso medicinal não está estabelecido, como as plantas do gênero *Buchenavia* (LOPES e MARUO, 2015).

Com o aumento alarmante da resistência microbiana aos medicamentos convencionais em todo o mundo, o uso de novas fontes de substâncias antimicrobianas como alternativa aos medicamentos convencionais tem aumentado (AYUKEKBONG et al., 2017; VASAN et al., 2019; MANGANYI e ATEBA, 2020). Além disso, o desenvolvimento da resistência microbiana contra agentes quimioterápicos, como os antibióticos, torna essencial e urgente o rastreamento de novas terapêuticas eficazes, seguras, baratas e disponíveis para a população (ATEF et al., 2019).

A microbiota fúngica endofítica possui alta capacidade metabólica e pode estar relacionada com a produção de uma infinidade de metabólitos secundários que podem ser explorados, como antimicrobianos, anti-inflamatórios, agentes antitumorais, antioxidantes e mesmo como promotores de crescimento vegetal. O uso de fungos endofíticos ao invés de plantas é muito interessante, pois reduz o tempo, custo e área de produção e são, desta forma, uma alternativa ecologicamente sustentável e economicamente viável de obtenção destas substâncias (RODRIGUEZ e REDMAN, 2008).

As características químicas e os metabólitos secundários produzidos pelas plantas do gênero *Buchenavia* têm sido associados a atividades biológicas importantes, como antibacteriana, antifúngica e anti-HIV (LOPES e MARUO, 2015; TEODORO et al., 2015; CAVALCANTI et al., 2017; BEUTLER et al., 1992). As propriedades antimicrobianas de extratos de *Buchenavia tomentosa* já foram observadas anteriormente, mas a comunidade fúngica endofítica ainda não foi examinada quanto ao seu potencial bioativo (BRIGHENTI et al., 2014; TEODORO et al., 2015). Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a produção de substâncias antimicrobianas produzidas por fungos endofíticos associados à *Mirindiba* (*B. tomentosa*).

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do espécime vegetal *Buchenavia tomentosa* Eichler

O material vegetal foi coletado de 5 árvores, situadas no Centro de Pesquisa Canguçu, no município de Pium, sudoeste do Estado do Tocantins, às margens da Ilha do Bananal, sob as coordenadas S 9° 58' 40" W 50° 02' 01.2"; S 9° 58' 40.3" W 50° 02' 00.9"; S 9° 58' 44.4" W 50° 02' 13.7"; S 9° 58' 46.7" W 50° 02' 09.3" e S 9° 58' 48.2" W 50° 02' 16.4". A exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual do Tocantins sob o código 8215.

Elaboração do extrato de *B. tomentosa* e avaliação da atividade bacteriana

O extrato aquoso de *B. tomentosa* foi obtido a partir da trituração de 12 folhas de tamanho médio em 500 ml de água mineral estéril. Em seguida a solução obtida foi acrescida de mais 500 ml de água mineral e, então, submetida a decocção por 2 min., totalizando 1L de extrato (chá).

O extrato foi avaliado contra os patógenos *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (NEWP 0083), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (NEWP 0128), *Shigella flexneri* (ATCC 12022) e *Streptococcus pneumoniae*, obtidos da coleção de culturas Carlos Rosa do Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada da Universidade Federal do Tocantins. Os micro-organismos estavam armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em caldo Brain Heart Infusion (BHI) com 20% de glicerol. Para reativação foram repicados em caldo Mueller Hinton e incubados por 24 h a $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa bacteriológica. Posteriormente, foram repicados para tubos de ensaio contendo ágar Nutriente inclinado e incubadas por 24 h a $36\text{ }^{\circ}\text{C}$, e armazenadas em geladeira a temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de preparo para os testes.

Os ensaios foram realizados de acordo com a técnica de micro diluição em caldo, em placas de 96 poços. Em cada cavidade da microplaca foram adicionados 100 μL de caldo Muller Hinton (CMH), 5 μL de suspensão de bactérias contendo 10^7 UFC/mL e 100 μL do extrato aquoso. Como controle positivo foi utilizado 100 μL CMH, 5 μL de suspensão de bactérias contendo 10^7 UFC/mL e 2 mg/mL de cloranfenicol e a suspensão de bacteriana. O controle negativo foi realizado com a inoculação de CMH, solvente DMSO 10% e inóculo. Para controle de crescimento foi utilizada 5 μL de suspensão de bactérias 10^7 UFC/mL. As placas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h (OLIVEIRA et al., 2016). Posteriormente, 30 μL de resazurina a 0,03% (m/v) estéril foi adicionada em cada cavidade para verificação do crescimento microbiano, sendo que a visualização de cor azul indicava de ausência de crescimento e cor rosa crescimento microbiano (PALOMINO et al., 2002 - modificado). O experimento foi qualitativo, realizado em triplicata.

Isolamento dos fungos endofíticos

Foram selecionadas 15 folhas de 5 árvores (3 folhas por árvore) para o isolamento dos fungos endofíticos. As folhas foram submetidas ao processo de desinfecção superficial para a eliminação de micro-organismos epifíticos, por meio de lavagens seriadas em etanol a 70% (v/v) (1 min.), hipoclorito de sódio 2 % (3 min.) e H_2O mQ estéril (2 min.). Após a desinfecção, três fragmentos de aproximadamente 0,5 cm^2 de cada material vegetal coletado foram transferidos para placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) suplementadas com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol.

As placas foram incubadas a 25 °C por até 20 dias. Os isolados foram transferidos para novas placas de Petri contendo BDA para purificação. Os micélios obtidos foram preservados em frascos estéreis contendo água destilada estéril, em duplicata e temperatura ambiente (CASTELLANI, 1967).

Preparação dos extratos fúngicos e avaliação da atividade antimicrobiana (concentração inibitória mínima – CIM)

Os fungos endofíticos foram reativados inoculando um disco de ágar BDA contendo o micélio de cada amostra em nova placa contendo BDA e incubando à 25 °C por 5 dias. Após esse período, foi realizada a fragmentação do micélio fúngico juntamente com o meio de cultivo, utilizando como líquido extrator o álcool etílico absoluto. Após 10 dias os macerados foram filtrados e os extratos brutos submetidos à remoção do solvente com auxílio de evaporador rotativo.

Os extratos obtidos foram solubilizados em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% e homogeneizados até completa dissolução (OLIVEIRA et al., 2016 - modificado). Os testes de concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados pela metodologia padronizada de microdiluição em caldo, em microplacas de 96 poços tipo Elisa, em triplicata (OLIVEIRA et al., 2016a). Em cada cavidade da microplaca foram adicionados 100 µL de caldo Muller Hinton (CMH). Em seguida adicionaram-se os extratos realizando diluição seriada. Foram realizadas 8 diluições de cada amostra obtendo-se concentrações finais de extrato de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,6; 0,78 mg/mL. Foram avaliadas como alvo de inibição as seguintes espécies de bactérias: *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis* e *Shigella flexneri*, nas concentrações de 10⁷ UFC/mL. Como controle positivo foi utilizado CMH, 2 mg/mL de cloranfenicol e as culturas bacterianas, como controle negativo foi utilizado CMH, solvente DMSO 10% e inóculo bacteriano. Para controle de crescimento foi utilizada 5 µL de suspensão de bactérias 10⁷ UFC/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h (OLIVEIRA et al., 2016).

Posteriormente, em cada cavidade da microplaca foi adicionada 30 µL de resazurina a 0,03% (m/v) estéril para verificação visual do crescimento microbiano, sendo a presença de cor azul representativa de ausência de crescimento e cor rosa, presença de crescimento microbiano (PALOMINO et al., 2002 - modificado). Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiano.

Avaliação da atividade antifúngica dos extratos aquosos dos fungos endofíticos de *B. tomentosa*

Os fungos endofíticos isolados foram testados pelo método da cultura pareada quanto à produção de substâncias difusíveis e voláteis frente ao fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*. Os isolados

endofíticos foram previamente cultivados em BDA por 5 dias. Em seguida, um disco de ágar de 0,5 cm de diâmetro contendo micélio de cada fungo endofítico foi inoculado em um lado de uma placa de Petri contendo BDA e incubado por 3 dias a 25 °C. Posteriormente, um disco similar contendo uma cultura do fitopatógeno foi inoculado na outra extremidade da placa (4 cm de distância). O diâmetro da colônia do patógeno foi estimado após incubação por dois dias a 25 °C, com auxílio de um paquímetro digital (Starret® 799), e comparado com o diâmetro observado na cultura controle (PINTO *et al.*, 2011).

Para a verificação da produção de substâncias voláteis foram utilizadas placas de Petri com uma divisória a fim de evitar o efeito da difusão. As placas foram seladas com parafilme para evitar possível dissipação das substâncias presentes.

O padrão de crescimento do fitopatógeno (cultura controle) foi obtido por meio da inoculação de um disco de ágar de 0,5 cm de diâmetro contendo micélio do fitopatógeno sozinho em Placas de Petri contendo BDA. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 encontram-se os resultados da atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *B. tomentosa*. Três, das 11 cepas bacterianas testadas, apresentaram sensibilidade aos compostos ativos da planta (*Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis* e *Shigella flexneri*), demonstrando um possível potencial de utilização desta espécie vegetal para obtenção de substâncias antibacterianas contra patógenos resistentes a antimicrobianos comerciais utilizados na atualidade. Estudos anteriores demonstraram que extratos de *B. tomentosa* obtidos por outros métodos exerceram inibição sobre *S. aureus* (acetato de etila), *E. faecalis* (fração hexânica) e *P. aeruginosa* (extrato etanólico) (BATISTA *et al.*, 2011; GIRONDI *et al.*, 2017).

Tabela 1 – Atividade antibacteriana do extrato aquoso da Mirindiba (*Buchenavia tomentos*) contra cepas de: *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pneumoniae*.

Patógenos	Inibição
<i>Bacillus cereus</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+
<i>Shigella flexneri</i>	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-

+ inibição do crescimento, - ausência de inibição do crescimento.

Esse resultado contrastante possivelmente ocorreu pela diferença de polaridade dos compostos extraídos por cada método. Enquanto a ação inibitória dos extratos aquosos envolve as substâncias hidrofílicas (aminoácidos, açúcares, alcaloides na forma de sal, saponinas, heterosídeos, flavanóides e as mucilagens), os extratos alcoólicos e hexânicos fornecem uma extração mais ampla, incluindo compostos menos polares, e conseqüentemente mais propriedades antifúngicas e antimicrobianas (SIMÕES, 2001). No entanto, o extrato aquoso é um método mais simples, mais próximo do uso pelas comunidades tradicionais e da população de um modo geral.

As plantas da família Combretaceae têm sido utilizadas como medicinais em todo o mundo, especialmente na Ásia e África (FYHRQUIST et al., 2002). Dentre os 20 gêneros pertencentes à esta família, o gênero *Buchenavia* apresenta atividades biológicas promissoras, como os observados por OLIVEIRA et al.(2012): ampla atividade antimicrobiana (inibição de crescimento de *Micrococcus luteus* (CIM: 0,10 mg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (CIM: 0,20 mg/mL), *Mycobacterium smegmatis* (CIM: 0,39 mg/mL), *Proteus vulgaris* e *Staphylococcus aureus* (CIM: 0,78 mg /mL para ambos)), além da presença de flavonóides, triterpeno, carboidrato e tanino.

Os frutos de *B. tomentosa* foram relatados como tóxicos para ovinos, caprinos e bovinos, mas um estudo fitoquímico realizado por Batista (2011) identificou 7 substâncias de caráter antimicrobiano

e antiradicalar (radicais livres) em *B. tomentosa*, sendo eles os ácidos fenólicos galato etila (1) e galato de metila (2), ácido gálico (3), os taninos hidrolisáveis corilagina (4) e buchenavina (5), e as lignanas pinoresinol (6) e o epipinoresinol (7) (MELO et al., 2010).

Sabendo-se da capacidade de endofíticos sintetizarem metabólitos bioativos semelhantes às plantas hospedeiras (SHARMA e KUMAR, 2021), o isolamento realizado nesta pesquisa resultou na obtenção de 22 isolados de fungos endofíticos, obtidos a partir das folhas de *B. tomentosa*. Estes isolados foram testados contra as bactérias *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis* e *Shigella flexneri*, que foram as espécies sensíveis ao extrato aquoso da planta. Estas bactérias foram selecionadas para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos fúngicos. Destes 22 fungos, 7 apresentaram atividade antimicrobiana (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) de fungos endofíticos isolados de *B. tomentosa* contra as bactérias *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis* e *Shigella flexneri*.

Fungo endofítico	CIM (µg/ml)		
	Bactéria		
	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. epidermidis.</i>	<i>S. flexneri</i>
FC12	25	25	50
FC13	100	100	-
FC31	50	25	100
FC49	50	50	-
FC53	50	50	-
FC81	25	50	-
FC93	-	-	25

* (-) Não houve inibição nas concentrações testadas: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,6; 0,78 mg/mL.

O uso de isolados fúngicos de folhas de *B. tomentosa* na literatura é inexistente, sendo este o primeiro trabalho a testar seu efeito antimicrobiano e, portanto, não há dados comparativos. Os extratos fúngicos que apresentaram atividade antimicrobiana mais abrangentes foram os obtidos dos isolados FC12 e FC31 (inibiram as três bactérias avaliadas, *S. typhimurium*, *S. epidermidis* e *S. flexneri*). Em todos os extratos fúngicos avaliados, pelo menos um foi capaz de inibir as bactérias na concentração de 25 µg/ml, sendo esta a menor concentração inibitória de extrato fúngico observada. Ressalta-se que as *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. compõem a lista de agentes patogênicos prioritários da Organização Mundial da Saúde para a produção e desenvolvimento de novos antibióticos, reforçando a importância desses resultados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

A atividade antimicrobiana das famílias químicas contra bactérias é classificada na ordem: fenóis > aldeídos > cetonas > álcoois > éteres > hidrocarbonetos (NOWAK et al., 2012; FADIL et al., 2018). Além dos compostos químicos já mencionados identificados nos frutos da *B. tomentosa*, Girondi et al., (2017) identificaram os compostos: ácido gálico, ácido quínico, kaempferol, epicatequina, ácido elágico e vitexina e Eschweilenol C nas folhas, com atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Os resultados encontrados na atual pesquisa correspondem ao padrão mencionado, reforçando a potência dos ácidos fenólicos predominantes nessa planta. Possivelmente, os fungos endofíticos presentes nas folhas sintetizam partes destes compostos através de suas vias metabólicas secundárias, inibindo os mesmos micro-organismos sensíveis ao extrato aquoso das folhas utilizado como triagem de patógenos neste estudo. Ressalta-se que questões como localização geográfica, clima, pragas e condições variadas na rizosfera podem causar variação dos constituintes químicos de plantas do mesmo gênero e espécie (JAYATILAKE e MUNASINGHE, 2020).

Brighenti et. al (2017) testaram a atividade antifúngica de extratos de *B. tomentosa* contra fungos leveduriformes e observaram atividade antibiofilme em *Candida albicans* a partir de ação dos ácidos elágico e gálico.

Nesta pesquisa foi identificado controle de crescimento do fungo filamentosso *R. stolonifer*, demonstrando uma potencial utilização na destes fungos como agentes de controle biológico. O isolado FC123 foi capaz de inibir 53% o crescimento de *R. stolonifer* através da difusão de substâncias. Apesar de outros métodos químicos e térmicos serem comuns no controle de *R. stolonifer* em alimentos, a busca de novos agentes antimicrobianos à base de plantas e micro-organismos tem sido intensa devido à resistência do fungo aos fungicidas sintéticos (ELIZEI et al., 2016).

O fungo *Rhizopus stolonifer* é o agente causador da podridão mole em frutos, considerado um dos principais causadores de doenças pós-colheita, responsável por cerca de 50% de perda de frutos que seriam comercializados (BASSETTO et al., 2007).

Seu controle é de grande interesse comercial, biotecnológico, social e ambiental, sendo o controle biológico um método alternativo e eficiente na prevenção da deterioração pós-colheita de frutos, e consequentemente redutor da quantidade de resíduos químicos aplicados nesses alimentos (BONILLA, 2019).

CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo a explorar fungos endofíticos de *Buchenavia tomentosa* e avaliar suas potenciais atividades antimicrobianas *in vitro*. Os isolados FC12 e FC31 foram eficazes em inibir o crescimento dos três patógenos bacterianos avaliados. A concentração inibitória mínima observada de

25 µg/ml por pelo menos um endofítico contra os patógenos avaliados. Os isolados endofíticos testados constituem potenciais fontes de substâncias antimicrobianas. As confirmações poderão ser feitas após a verificação dos níveis de citotoxicidade e das caracterizações químicas.

O isolado FC123 produziu substâncias difusíveis capazes de inibir o fungo fitopatogênico *R. stolonifer*.

Novos estudos deverão ser realizados para identificar as espécies endofíticas e as substâncias antimicrobianas por elas produzidas

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 429435/2018-5 e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Programa Pró-Amazônia, Número: 23038.010315/2013-66. Agradecemos ainda à técnica Adrielly pelo trabalho realizado junto ao Herbário da Universidade Estadual do Tocantins no depósito da exsicata da planta *B. tomentosa*.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

ALAMGIR, A. N. M. Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1. Progress in Drug Research, 73. Chapter 1, p. 2, 2017.

ATEF, N. M.; SHANAB, S. M.; NEGM, S.I.; ABBAS, Y. A. Evaluation of antimicrobial activity of some plant extracts against antibiotic susceptible and resistant bacterial strains causing wound infection. Bulletin of the National Research Centre, v. 43, n. 144, 2019.

AYUKEKBONG, J. A.; NTEMGWA, M.; ATABE, A. N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies. Antimicrobial Resistance & Infection Control, v. 6, n. 47, 2017.

BASSETTO, E.; AMORIM, L.; BENATO, E. A.; GONÇALVES, F. P.; LOURENÇO, S. A. Efeito da irradiação UV-C no controle da podridão parda (*Monilinia fructicola*) e da podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em pós-colheita de pêssegos. Fitopatologia Brasileira, v. 32, n. 5, p. 393-399, 2007.

BATISTA, A. L. Avaliação da atividade antimicrobiana e antiradicalar dos extratos e substâncias dos frutos de *Buchenavia tomentosa* – Eichler (Combretaceae) e *Ouratea spectabilis* Aubl. (Ochnaceae). Campo Grande; 2011. [Tese – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

BEUTLER, J. A.; CARDELLINA, I. I. J. H.; MCMAHON, J. B.; BOYD, M. R.; CRAGG, G. M. Anti-HIV and Cytotoxic Alkaloids from *Buchenavia capitata*. *Journal of Natural Product*, v.55, n.2, p.207-213, 1992.

BRIGHENTI, F. L.; SALVADOR, M. J.; DELBEM, A. C. B. Systematic Screening of plant extracts from the Brazilian pantanal with antimicrobial activity against bacteria with cariogenic relevance. *Caries Research*, v. 48, n.5, p. 353–360, 2014.

BRIGHENTI, F. L.; SALVADOR, M. J.; GONTIJO, A. V. L.; DELBEM, A. C. B.; DELBEM, Á. C. B.; SOARES, C. P.; OLIVEIRA, M. A. C.; GIRONDI, C. M.; KOGA-ITO, C. Y. Plant extracts: initial screening, identification of bioactive compounds and effects against *Candida albicans* biofilms. *Future Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 15-27, 2017.

BONILLA, C. M. Utilización de agentes de biocontrol para prevenir el deterioro de la fruta en poscosecha. Máster Universitario en Seguridad y Calidad de los Alimentos. Repositorio institucional de la Universidad de La Laguna. Disponível em: <<http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/17327>>. Acesso em: 09 de set de 2022.

CASTELLANI, A. Maintenance and Cultivation of Common Pathogenic Fungi of Man in Sterile Distilled Water. *Further Researcher. Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 70, p. 181-184, 1967.

CAVALCANTI FILHO, J. R. N.; SILVA, T. F.; NOBRE, W. Q.; OLIVEIRA DE SOUZA; L. I., SILVA E SILVA FIGUEIREDO, C. S.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. D.; FYHRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; HÆGGSTRÖM, C. A. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. *Journal of Ethnopharmacology*, v.79, n. 2, p. 169-177, 2002.

ELIZEI, V. G.; CHALFOUN, S. M.; BOTELHO, D. M. D. S.; REBELLES, P. P. R. Atividade antifúngica, in vitro, do óleo de café verde. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 83, 2016.

FADIL, M.; FIKRI-BENBRAHIM, K.; RACHIQ, S.; IHSSANE, B.; LEBRAZI, S.; CHRAIBI, M.; HALOUI, T.; FARAH, A. Combined treatment of *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils against *Salmonella typhimurium*: Optimization of antibacterial activity by mixture design methodology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, p. 211-220, 2018.

GUSMÃO, N. B.; SILVA, M. V.; DA SILVA, L. C. N.; CORREIA, M. T. D. S. Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions. *Pharmaceutical Biology*, v. 55, n. 1, p. 1521-1527, 2017.

GIRONDI, C. M.; OLIVEIRA, A. B.; PRADO, J. A.; KOGA-ITO, C. Y.; BORGES, A. C.; DELBEM, A. C. B.; PEREIRA, D. F. A.; SALVADOR, M. J.; BRIGHENTI, F. L. Screening of plants with antimicrobial activity against enterobacteria, *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus* spp. *Future Microbiology*, v.12, n.8, p. 671-681, 2017.

JAYATILAKE, P. L.; MUNASINGHE, H. Antimicrobial Activity of Cultivable Endophytic and Rhizosphere Fungi Associated with "Mile-a-Minute," *Mikania cordata* (Asteraceae). *BioMed Research International*, v. Jun 15, p. 5292571, 2020.

LOPES, D.; MARUO, V. Toxicidade de *Buchenavia tomentosa* – revisão de literatura. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, v. 23, n. 1, p. 1-13, 2015.

MANGANYI, M. C.; ATEBA, C. N. Untapped Potentials of Endophytic Fungi: A Review of Novel Bioactive Compounds with Biological Applications. Microorganisms, v. 8, n. 12, p. 1934, 2020.

MELLO, G. W., OLIVEIRA, D. M., CARVALHO, C. J., PIRES, L. V., COSTA, F. A., RIET-CORREA, F., & SILVA, S. M. Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Norte Piauiense. Pesquisa Veterinária Brasileira, 30, 1-9, 2010.

NOWAK, A.; KALEMBA, D.; KRALA, L.; PIOTROWSKA, M.; CZYZOWSKA, A. The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere. Food microbiology, v. 32, n.1, p. 212-216, 2012.

OLIVEIRA, Y. L. C.; NASCIMENTO, DA SILVA L. C.; DA SILVA, A. G. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (*Combretaceae: Combretoideae*). The Scientific World Journal, v. 6, 2012: 849302, 2012.

OLIVEIRA, A. I. T. DE; MAHMOUD, T. S.; NASCIMENTO, G. N. L. DO; SILVA, J. F. M. DA; PIMENTA, R. S.; MORAIS, P. B. DE. Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Palm Leaf Extracts from Babaçu (*Attalea speciosa*), Buriti (*Mauritia flexuosa*), and Macaúba (*Acrocomia aculeata*). The Scientific World Journal, v. 2016, p. 1-5, 2016.

OLIVEIRA, G. R. F.; SILVA, M. S.; MARCIANO, T. Y. F.; PROENÇA, S. L.; SÁ, M. E. Crescimento inicial do feijoeiro em função do vigor de sementes e inoculação com *Bacillus subtilis* / early growth of common bean plants in response to vigour seeds and inoculation with *Bacillus subtilis*. Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas, v. 10, n. 4, p. 439-448, 2016a.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PINTO, W S; ROSA L H ; SILVA, J. F. M. PIMENTA, R. S.. Diversity and antimicrobial activities of endophytic fungi of *Myrcia sellowiana* (Myrtaceae) from Tocantins. Acta Horticulturae, v. 905, p. 283-286, 2011.

RAO, M. M. V.; HARIPRASAD, T. P. N. In silico analysis of a potential antidiabetic phytochemical erythrin against therapeutic targets of diabetes. In Silico Pharmacology, v. 9, n. 5, 2021.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: Plant stress tolerance via fungal symbiosis. Journal of Experimental Botany, v. 59, p. 1109–1123, 2008.

SHARMA, P.; KUMAR, S. Bioremediation of heavy metals from industrial effluents by endophytes and their metabolic activity: Recent advances. Bioresource Technology, v. 339, 125589, 2021.

SIMÕES, C. M. O. et al. (org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. ed. rev. – Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2001

TEODORO, G. R.; BRIGHENTI, F. L.; DELBEM, A. C.; DELBEM, Á. C.; KHOURI, S.; GONTIJO, A. V.; PASCOAL, A. C.; SALVADOR, M. J.; KOGA-ITO, C. Y. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. *Future Microbiology*, v. 10, n. 6, p. 917-927, 2015.









VASAN, N.; BASELGA, J.; HYMAN, D. M. A view on drug resistance in cancer. *Nature*, v. 575, p. 299–309, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017. <<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-whopublishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>. Acesso em 30 de outubro de 2022.

ANEXO V – Artigo “In Vitro Cytotoxic Effects and Mechanisms of Action of Eleutherine Isolated from *Eleutherine plicata* Bulb in Rat Glioma C6 Cells” publicado na revista Molecules e materiais suplementares.

Article

In Vitro Cytotoxic Effects and Mechanisms of Action of Eleutherine Isolated from *Eleutherine plicata* Bulb in Rat Glioma C6 Cells

Victoria Mae Tsuruzaki Shinkai ^{1,2}, Izana Marize Oliveira Sampaio ², Eline Gomes dos Santos ², Adan Jesús Galué-Parra ³ , Dionisia Pelaes Ferreira ^{4,5}, Drielly Dayanne Monteiro Santos Baliza ⁶ , Neidiane Farias Ramos ², Raphael Sanzio Pimenta ⁶ , Rommel Mario Rodriguez Burbano ⁷ , Chubert Bernardo Castro Sena ³ , Barbarella Matos Macchi ^{1,2,8} , Irlon Maciel Ferreira ^{4,5} , Edilene Oliveira Silva ^{3,9}  and José Luiz Martins do Nascimento ^{1,2,8,*}

- ¹ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belem 66075-110, Brazil
- ² Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belem 66075-110, Brazil
- ³ Laboratório de Biologia Estrutural, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belem 66075-110, Brazil
- ⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapa 68902-280, Brazil
- ⁵ Laboratório de Biotatálise e Síntese Orgânica Aplicada, Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal do Amapá, Macapa 68902-280, Brazil
- ⁶ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Região Norte, Universidade Federal do Tocantins, Palmas 77001-090, Brazil
- ⁷ Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belem 66075-110, Brazil
- ⁸ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Neuroimunomodulação (INCT-NIM), Rio de Janeiro 21040-900, Brazil
- ⁹ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (INCT-INBEB), Rio de Janeiro 21941-902, Brazil
- * Correspondence: donascimentojlm@gmail.com or jlmn@ufpa.br; Tel.: +55-91-32017545



Citation: Shinkai, V.M.T.; Sampaio, I.M.O.; dos Santos, E.G.; Galué-Parra, A.J.; Ferreira, D.P.; Baliza, D.D.M.S.; Ramos, N.F.; Pimenta, R.S.; Burbano, R.M.R.; Sena, C.B.C.; et al. In Vitro Cytotoxic Effects and Mechanisms of Action of Eleutherine Isolated from *Eleutherine plicata* Bulb in Rat Glioma C6 Cells. *Molecules* **2022**, *27*, 8850. <https://doi.org/10.3390/molecules27248850>

Academic Editor: Yujun Zhao

Received: 1 November 2022

Accepted: 5 December 2022

Published: 13 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Gliomas are the most common primary malignant brain tumors in adults, and have a poor prognosis, despite the different types of treatment available. There is growing demand for new therapies to treat this life-threatening tumor. Quinone derivatives from plants have received increased interest as potential anti-glioma drugs, due to their diverse pharmacologic activities, such as inhibiting cell growth, inflammation, tumor invasion, and promoting tumor regression. Previous studies have demonstrated the anti-glioma activity of *Eleutherine plicata*, which is related to three main naphthoquinone compounds—eleutherine, isoeleutherine, and eletherol—but their mechanism of action remains elusive. Thus, the aim of this study was to investigate the mechanism of action of eleutherine on rat C6 glioma. In vitro cytotoxicity was evaluated by MTT assay; morphological changes were evaluated by phase-contrast microscopy. Apoptosis was determined by annexin V-FITC-propidium iodide staining, and antiproliferative effects were assessed by wound migration and colony formation assays. Protein kinase B (AKT/pAKT) expression was measured by western blot, and telomerase reverse transcriptase mRNA was measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Eleutherine reduced C6 cell proliferation in a dose-dependent manner, suppressed migration and invasion, induced apoptosis, and reduced AKT phosphorylation and telomerase expression. In summary, our results suggest that eleutherine has potential clinical use in treating glioma.

Keywords: glioma C6; rat brain tumor; *Eleutherine plicata*; eleutherine; cytotoxicity

1. Introduction

Glioma is a fatal malignancy derived from the glial cell lineage with a high recurrence rate. Although less prevalent than other neoplasms, 60% are aggressive high-grade gliomas (grade IV), which migrate and strongly infiltrate the brain parenchyma [1–5]. Gliomas, in general, are responsible for approximately 38% of primary brain tumors, and represent more than 70% of all central nervous system (CNS) tumors, the most frequent and malignant being glioblastoma multiforme [6,7]. Glioblastomas have the highest proportion of malignancy and the worst prognosis of CNS tumors. Only 5.5% of patients usually survive for 5 years after diagnosis [8] and have a 1-year survival rate because of the limitations of treatment's approaches [9].

Treatment strategies for glioma differ, depending on tumor size, location, and distinct tumor subtype, and involve a combination of surgery, radiotherapy, and chemotherapy. Typically, glioma chemotherapy includes the antibody nimotuzumab and temozolomide, but their efficacy is low, and these tumors have poor prognosis [10–14]. In addition, gliomas develop resistance to numerous drugs [15–19]. Therefore, there is a real need for new antitumor agents to treat this deadly cancer, and efforts are ongoing to identify more efficient and active molecules to regulate the tumor's progression.

Several plants, such as *Eleutherine plicata*, *Eleutherine americana*, and *Cipura paludosa*, are important sources of chemicals and contain high levels of naphthoquinones, a class of natural products with diverse biological activities. Aqueous extracts of the dried bulbs of these herbs have been described to generate oxidative stress by inducing the deleterious endogenous formation of a bioactive oxygen-derived species that inhibits inflammation, promotes apoptosis, and exhibits important anticancer properties in different cancer cell lines, such as glioma (U-251), breast (MCF-7), ovary (NCI/ADR-RES), kidney (786-0), lung non-small cell (NCI-H460), colon (HT-29), HepG2 cells, and leukemia (K562) [20,21].

These effects are mainly related to the presence of naphthoquinones, more specifically eleutherine, isoeleutherine, and eleutherol (Figure 1) [20,22]. Previous works have demonstrated the antiproliferative effect of eleutherine and isoeleutherine isolated from a methanolic extract of *Cipura paludosa* bulbs in glioma (U251) and breast cancer (MCF-7) lines [20]. The results indicate that eleutherine is more cytotoxic than isoeleutherine. These compounds are epimeric isomers and have a 1,4-naphthoquinone moiety with only one structural difference, the β -methyl group of eleutherine and the α -methyl group of isoeleutherine. Thus, it follows that the higher activity of eleutherine is related to the chirality of its pyran ring with the β -methyl group [20].

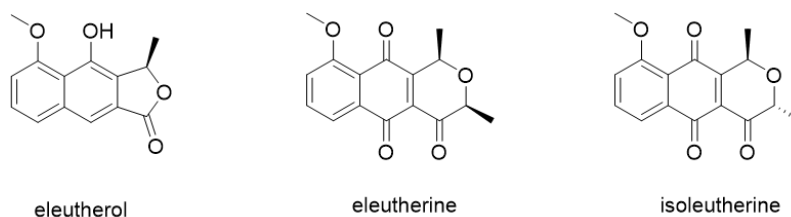


Figure 1. Chemical structures of eleutherol, eleutherine, and isoeleutherine.

Some studies suggest that naphthoquinones may exert their regulatory activities in cancer cells by acting on different signal transduction pathway family proteins, such as phosphatidylinositol-3-kinase/AKT and MAP kinase (MAPK) [23–25]. In addition, it is known that eleutherine reversibly inhibits the catalytic activity of human topoisomerase II by stabilizing the DNA–enzyme complex in the presence of ATP [26]. Thus, by inhibiting the activity of this enzyme, eleutherine can cause transient double-strand breakage in DNA and contribute to biological oxidative processes [27,28].

These activities open new opportunities for pharmacotherapy, especially for cancer [20,29,30]. However, eleutherine's mechanism of action remains elusive. Thus, isolated eleutherine was used in this work to elucidate a possible mechanism of its action on C6 glioma cells.

2. Results

2.1. Characterization of the Compound Isolate

The compound isolated from *Eleutherine plicata* bulbs was obtained as a brownish yellow crystal. Starting from 3 g of the lyophilized ethanolic extract yielded over 49 mg of the pure compound, with 95% relative concentration (Figure 2, see Supplementary Figures S1 and S2), with MS (70 eV, EI) 272 (42), 257 (100), 243 (52), 214 (32), 157 (10), and 121 (25), and the probable molecular formula was deduced as $C_{14}H_{12}O_4$. The melting point was of 144–146 °C. The IR spectrum showed the presence of characteristic peaks, such as $-C-H_{sp^2}$ (2974 cm^{-1}), $-C-H_{sp^3}$ (2913), $-C=O$ (1777 cm^{-1}), of benzene ring (1582 cm^{-1}) absorptions. The molecular characterization data were compared with those in the literature [31].

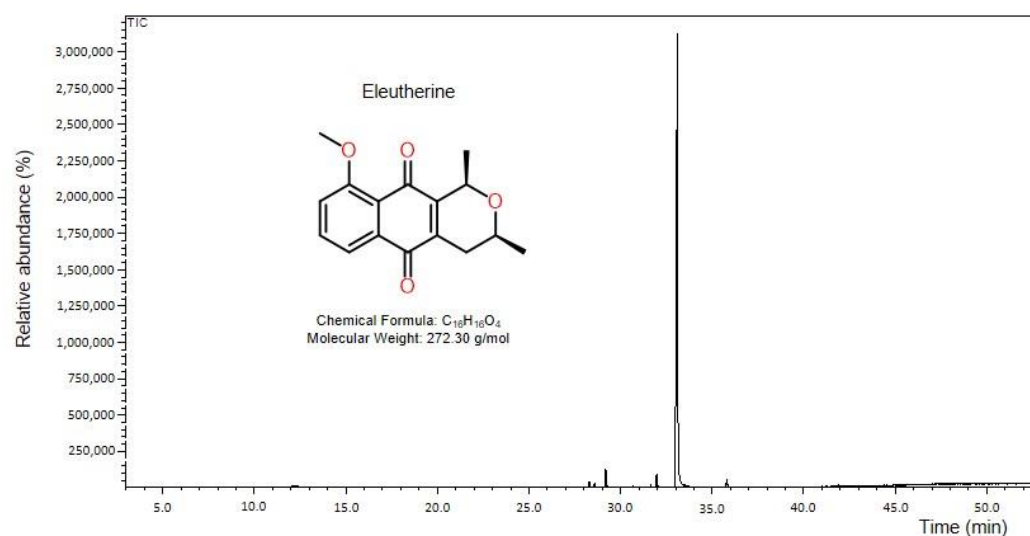


Figure 2. Chromatogram of eleutherine isolated from the bulbs of *Eleutherine plicata*. Peak area (95.03%) and retention time at 33.10 min.

2.2. Cytotoxic Effect of Eleutherine Treatment on C6 Cells

Eleutherine presented a cytotoxic effect on C6 cells. After 6 and 12 h of treatment, cell death was observed at 1 μM with IC_{50} of 32.33 μM (± 1.25) and 28.46 μM (± 1.85), respectively (Figure 3A,B). During 24 h of treatment, a cytotoxic effect was observed at a concentration range of 0.05–100 μM , with an IC_{50} of 4.98 μM (± 0.22) (Figure 3C). Thus, eleutherine reduced cell viability in a concentration- and time-dependent manner (Figure 3D).

2.3. Morphological Changes in C6 Cells after Eleutherine Treatment

No structural changes were observed in the control, which was characterized by the presence of fusiform cells and monolayer cells. Cells treated with eleutherine at 1 μM presented small morphological changes. However, cells treated at 20 and 40 μM showed structural changes characteristic of apoptosis, such as large and round cells and irregularly shaped cells with cytoplasmic shrinkage (white arrow). Treatment with eleutherine at 100 μM resulted in cell death (black arrow) (Figure 4).

2.4. Eleutherine Reduces Colony Formation by C6 Cells

Treatment with eleutherine at 20, 40, and 100 μM for 12 h resulted in decreases in colony formation (52.44%, 94.52%, and 99.18%, respectively) compared with that observed in the untreated group. No reduction in colony formation was observed at 1 μM eleutherine (Figure 5).

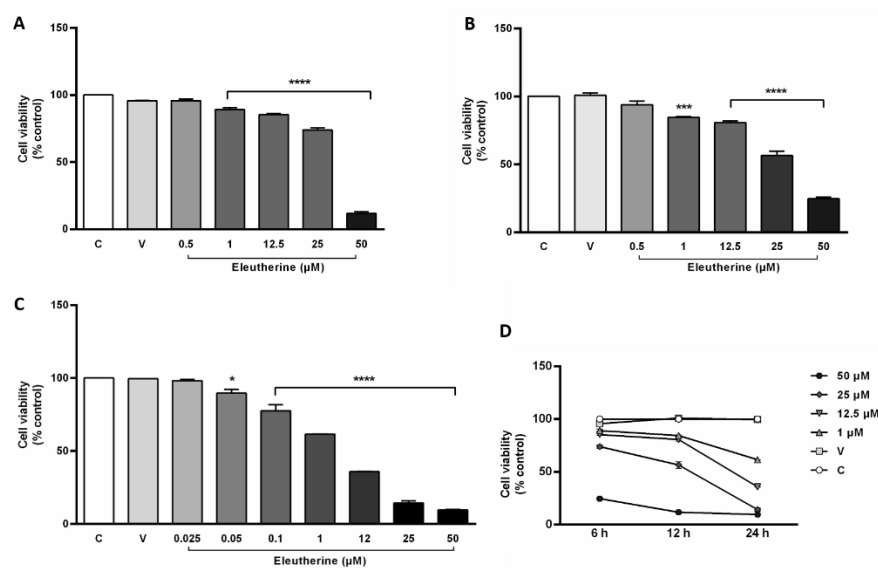


Figure 3. Eleutherine reduced the viability of glioblastoma cells as measured by the MTT assay. Cells were treated with different concentrations of eleutherine for 6 h (A), 12 h (B), and 24 h (C). (D) Cell viability curve showing the concentration and time-dependence of eleutherine's effect. Data are presented as the mean \pm SEM of three independent trials. Here, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ vs. untreated control (ANOVA, Tukey's post hoc test); C, control; V, vehicle.

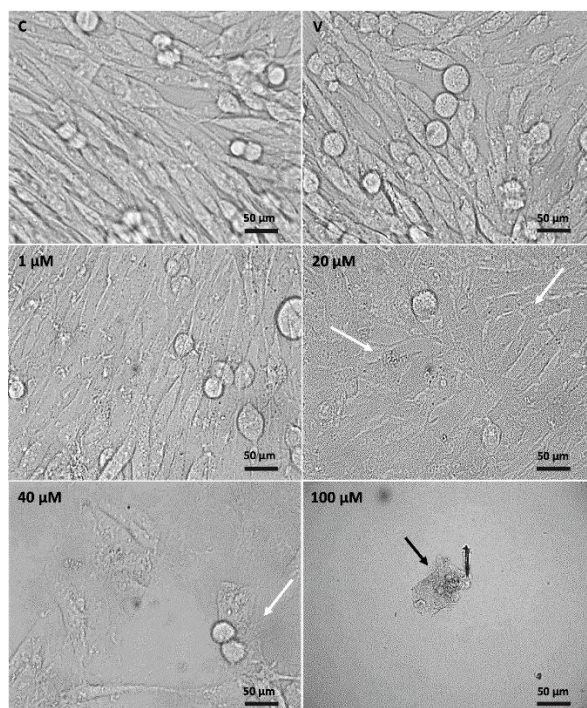


Figure 4. Morphological alterations in untreated C6 cells and after treatment with eleutherine at different concentrations (1, 20, 40, and 100 μM) for 12 h. Cells were examined using a phase-contrast microscope (Leica DMI6000B). White arrow indicates irregularly shaped cells with cytoplasmic shrinkage and black arrow indicates cell death. Images were taken using a 63 \times objective; C, control; V, vehicle.

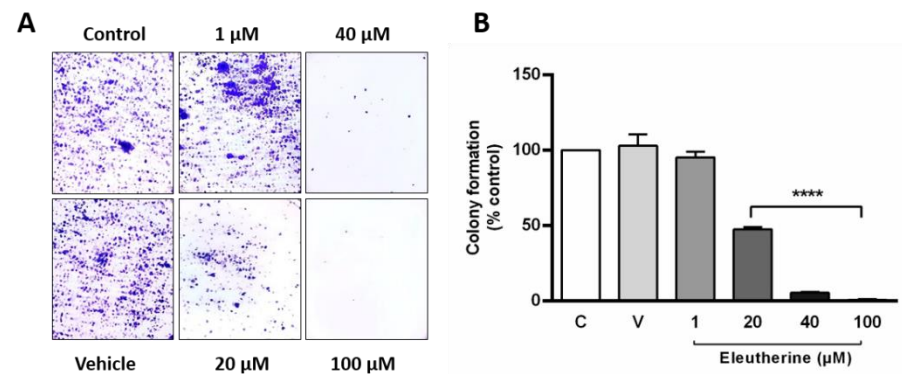


Figure 5. Eleutherine reduces colony formation in C6 cells. (A) C6 cells stained with crystal violet after eleutherine treatment for 12 h. (B) Graphic quantification of the colony numbers. Data are presented as the mean \pm SEM of three independent trials. Here, **** $p < 0.0001$ vs. untreated control (ANOVA, Tukey's post hoc test).

2.5. Eleutherine Induces C6 Cell Apoptosis

The annexin V–PI assay was used to confirm apoptotic cell death caused by eleutherine. The C6 cells were treated with different concentrations of eleutherine (1 μ M, 20 μ M, and 40 μ M) and displayed increased numbers of apoptotic cells, mainly in the late stages of apoptosis, as follows: at 1 μ M, 57%; at 20 μ M, 44.4%; and, at 40 μ M, 77%, compared with the control and positive control (camptothecin), as shown in Figure 6. Our results demonstrate that eleutherine induces apoptosis in a dose-dependent manner to a level higher than that observed in the positive control.

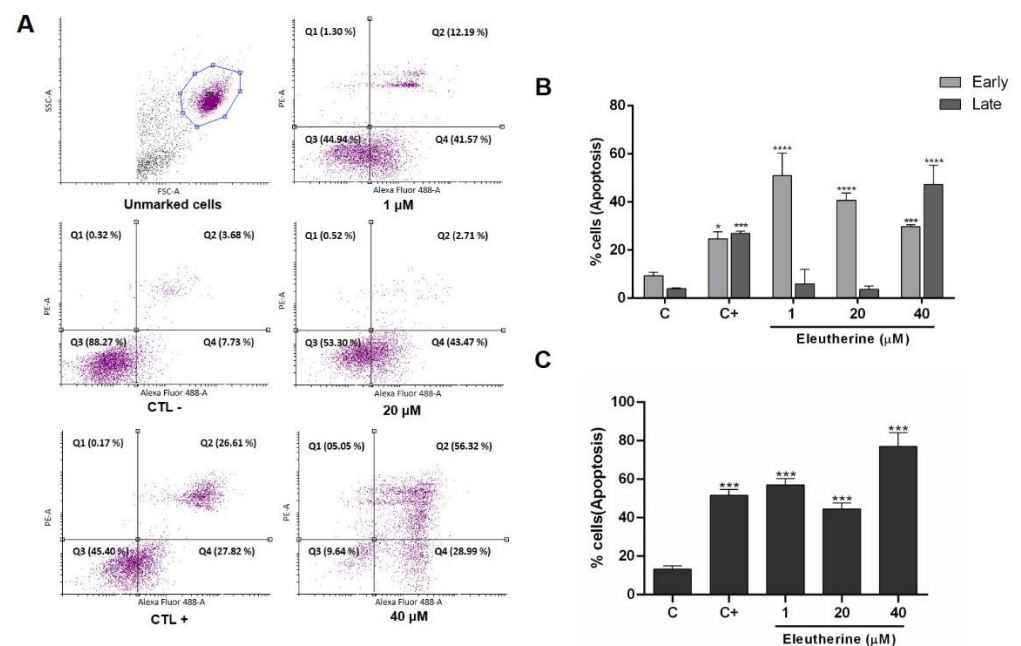


Figure 6. Eleutherine induces apoptosis in C6 cells. The cells were treated with eleutherine (1, 20, and 40 μ M) for 24 h. (A) Cells were stained with annexin V–FITC and propidium iodide (PI) and subjected to flow cytometry analyses. Early apoptotic cells were in the Q4 quadrant and late apoptotic cells were in the Q2 quadrant. (B) Quantification of the percentage of early and late apoptotic C6 cells. (C) Quantification of the percentage of total apoptotic C6 cells. Here, * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ compared with untreated control (ANOVA, Tukey's post hoc test); C, control; C+, positive control (camptothecin at 5 μ M).

2.6. Eleutherine Reduces the Expression of pAKT in C6 Cells

The expression of phosphorylated AKT was reduced after treatment with eleutherine by 48.84% at 20 μM and by 39.27% at 40 μM (Figure 7). Thus, the PI3K/AKT pathway in the glioma cells must be inhibited by the action of eleutherine.

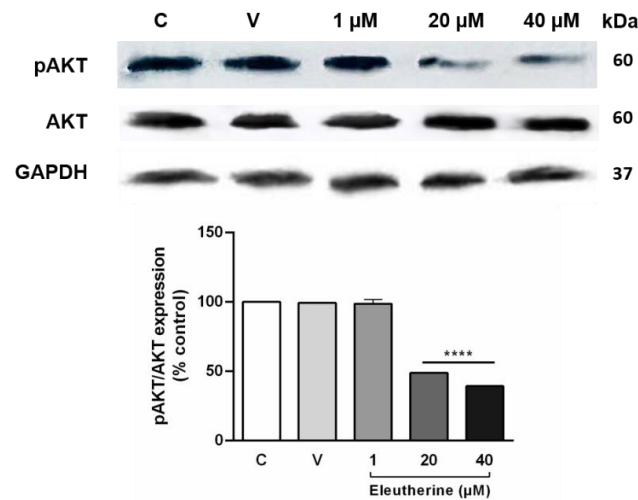


Figure 7. Eleutherine treatment reduced AKT phosphorylation in C6 cells. The expression of pAKT and AKT, and of GAPDH as the control protein, was detected by western blotting. The pAKT:AKT ratio is expressed as a percentage. The eleutherine treatment groups (20 and 40 μM) showed a greater reduction in AKT phosphorylation than was observed in the untreated group. Data are presented as the mean \pm SEM of three independent trials. Here, **** $p < 0.0001$ vs. untreated control (ANOVA, Tukey's post hoc test); C, control; V, vehicle.

2.7. Eleutherine Reduces Telomerase (*TERT*) mRNA Expression

Eleutherine treatment reduced TERT expression in a dose-dependent manner at 1 μM (17.1%), 20 μM (37.3%), and 40 μM (45.8%). The results suggest that after treatment of glioma cells with eleutherine there was a loss of telomerase activity that may have induced cell death (Figure 8).

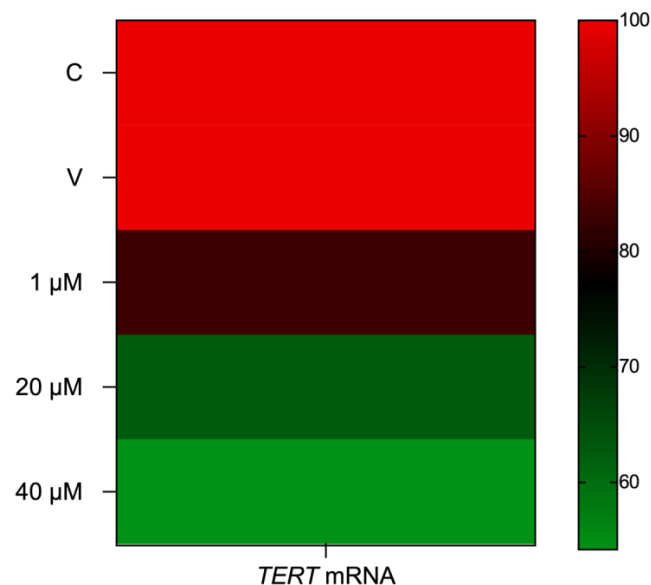


Figure 8. Heat map correlating eleutherine treatment with *TERT* mRNA expression in glioma cells. The color of each rectangle indicates the value of the Pearson correlation coefficient (ρ) between the eleutherine-treated groups and *TERT* mRNA expression.

3. Discussion

Naphthoquinones are significantly cytotoxic to different types of tumor cell lines. Recent evidence indicates that the antiproliferative activity of *Eleutherine plicata* is due to the presence of the three main naphthoquinones, namely eleutherine, isoeleutherine, and eleutherol [21]. Treatment of C6 cells with eleutherine resulted in a dose- and time-dependent change in cell viability. As expected, the IC₅₀ decreased with the treatment time, reaching 4.98 µM in cells exposed up to 24 h, demonstrating the effectiveness and potency of eleutherine. These findings are similar to those obtained with other naphthoquinone derivatives in primary cultures of cancer cells [30]. Eleutherine and isoeleutherine isolated from the bulbs of *C. paludosa* exhibited promising cytotoxicity against glioma (U-251), with IC₅₀ values between 2.6 and 13.8 mg/mL [20].

The IC₅₀ value obtained in our experiment is comparable to those reported in the literature. In addition, it was possible to verify that eleutherine does not have cytotoxic effects on normal glial cells (see Supplementary Figure S3), thus, proving its therapeutic potential and its safety in regard to healthy cells. From these results, we highlight the significant cytotoxic effect of eleutherine on C6 cells reported here.

Cancer cells, such as glioma cells, cause the failure of efficient cellular response and disable the inhibition of apoptosis. Our data indicate that eleutherine was able to induce apoptosis in C6 cells. Treatment resulted in increases in the apoptosis rates when analyzed by FITC-Annexin V/PI staining. The C6 cells treated with 40 µM eleutherine showed an increased rate of apoptosis, similar to a previous study with another naphthoquinone [32,33]. These data support the hypothesis that there is a correspondence between the IC₅₀ and the inhibition of proliferation and a high apoptosis rate.

Phase-contrast microscopy revealed structural changes produced by eleutherine. Cells treated with 20 µM, 40 µM, and 100 µM eleutherine retracted, decreased in size, and underwent significant cytoplasmic shrinkage, similar to cells undergoing apoptosis. These results clearly indicate that decreased cell size and cytoplasmic shrinkage may be related to cell death [34].

Moreover, through the colony formation assay, it was possible to observe the antiproliferative effect of eleutherine on cultured cells. The cells treated with 20 µM eleutherine formed significantly fewer colonies, and treatment with 40 µM and 100 µM eleutherine almost completely inhibited the formation of colonies. Interestingly, the ability to form colonies is a sensitive indicator of undifferentiated cancer stem cells [35,36]. These results indicate that eleutherine can act on stem cells, a therapeutic strategy which prevents cancer from relapsing.

Treatment with eleutherine inhibited the migration of glioblastoma cells in comparison with the untreated control group and the vehicle group. With 1 µM eleutherine, it was possible to observe a reduction in the proliferation of cells and, at 20 µM, the cells showed changes in morphology, suggesting apoptosis. The morphology was totally altered in a dose-dependent way at 12, 24, and 48 h. These findings corroborate the results of the cell viability assay, highlighting the considerable antitumor potential of eleutherine, similar to other naphthoquinones, in an in vitro model of glioblastoma [23–25,32,33,37,38].

The AKT pathway is important in the genesis of several types of cancer, being overexpressed and playing critical roles in the survival, proliferation, invasion, and migration of cancer cells. This pathway is vital in the development of glioma cells and related to metabolism, epithelial–mesenchymal transition, and angiogenesis, allowing the glioma to acquire a high degree of invasiveness and malignancy by bypassing the mechanisms of apoptosis [37,39–41]. In our study, we found that eleutherine decreased the expression of p-Akt and inhibited the PI3K/AKT pathway, resulting in glioblastoma cell death.

It is known that *TERT* is a component of telomerase, a reverse transcriptase ribonucleoprotein complex that maintains telomere length in cells with high proliferative ability, and that it plays a key role in cancer formation. Telomere maintenance is affected by *TERT* gene amplification and epigenetic changes, such as DNA methylation, *TERT* promoter germ line and somatic mutations, and *TERT* structural variants [42,43]. Catalytic inhibitors of

topoisomerases act either by inhibiting the binding of the enzyme to DNA or by preventing it from cleaving the DNA, compromising its cellular repair capacity [44,45]. Our results suggest that eleutherine, as with other naphthoquinones, reduces the telomerase activity that is critical to glioma cells growth [38].

More recent studies confirm the interaction of the telomerase with various intracellular signaling pathways including the PI3K/AKT/mTOR pathway, which mainly participates in inflammation, the epithelial-to-mesenchymal transition, and tumor cell invasion and metastasis [46,47]. Thus, a decrease in phosphorylated AKT expression inhibits hTERT expression, thereby reducing proliferative capacity, altering the cell cycle, and promoting apoptosis in glioma cells.

The results indicate that eleutherine treatment reduced the expression of phosphorylated AKT and *TERT* in a dose-dependent manner. These mechanisms directly influence the cell cycle and cells' ability to undergo apoptosis, which are of great interest in research on new antineoplastic therapies.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material

The specimens of *Eleutherine plicata* used in this study were obtained from a private medicinal plant plot in the city of Palmas, Tocantins, Brazil. The exicata is deposited in the Herbarium of the Federal University of Tocantins under the code number 8214.

4.2. Production of Raw Extract

For the preparation of extracts, *Eleutherine plicata* of an average size of 5 cm were ground in a blender with 2 mL of distilled water and subjected to decoction for 2 min, under agitation, according to Baliza et al. (2022) [48]. The mixture was distributed in extraction funnels, and hexane was added to the desired final volume. The funnel mixture was homogenized and allowed to sit until phase separation occurred. The hexane fraction was subjected to rotary evaporation to concentrate the extract in the flask. The flask was washed with hexane to loosen the evaporate that had stuck to the flask wall, and the concentrated extract was distributed among smaller flasks, which were left open in an exhaust hood for final evaporation and further concentration of the extract. After cooling, the material was filtered through No. 4 Whatman filter paper.

4.3. Extraction and Isolation

Initially, the ethanol extract was fractionated according to Tewierik et al. (2006) [30]. It was resuspended in 50 mL of a methanol/water solution (1:1) for 24 h, and was then subjected to a liquid/liquid partition, using solvents of increasing polarities in the order hexane, chloroform, and ethyl acetate. Sequentially, the fractions were analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS). Considering the results of this analysis, the isolation of the main compounds was carried out through separation by column chromatography, using silica gel as a stationary phase and hexane/ethyl acetate (90:10, 90:20, 85:15, and 80:20) as the mobile phase.

Next, the isolated compounds were characterized by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS), in a Shimadzu/GC 2010 device with a Shimadzu/AOC-500 auto-injector and a MS2010 plus mass detector with electronic impact ionization (IE, 70 and V), equipped with a DB-5MS fused silica column (Agilent J&W Advances 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), with helium at 65 kPa as the carrier gas. The conditions were as follows: oven temperature started at 100 °C for 2 min, increased to 290 °C at 4 °C min⁻¹ and held for 6 min; injector and interface temperature was maintained at 250 °C; splitless 1 μL injection; helium was used as the carrier gas at a constant flow 0.75 mL min⁻¹, and the run time was 30 min. The scan range was *m/z* 80–400. Retention times was 33 min. The final characterization was performed by infrared spectroscopy, using a Shimadzu IRAffinity-1 spectrometer operating with Fourier transform.

4.4. Cell Culture

Rat C6 glioblastoma cells (CCL-107TM, ATCC) were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and maintained in an incubator at 37 °C with 5% CO₂, with the medium changed every 2 days. To perform the experiments, cells were washed with PBS and dissociated with 0.05% trypsin-EDTA, followed by centrifugation (1500 rpm for 3 min). After counting, cells were resuspended in culture medium and used to carry out the proposed assays.

Primary cultures of Müller cells were obtained from 9-day-old embryos. Retinal tissue was collected, and cells were distributed in 24-well plates (1×10^6 cells/well). Cultures were grown for 10 days in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and kept in an incubator at 37 °C with 5% CO₂.

4.5. Cell Cytotoxicity Assay

Cells were plated (2×10^4 cells/well) in 96-well plates and treated with eleutherine at different times and concentrations (0.5–50 µM for 6 h and 12 h, and 0.025–50 µM for 24 h). After the treatment period, the cells were incubated for 2 h with 0.5 mg/mL MTT solution (thiazolyl blue tetrazolium bromide—M2128, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in serum-free DMEM. Absorbance was measured with a microplate reader (BioRad, Hercules, CA, USA) at 570 nm. The results obtained were plotted with the mean and standard deviation of samples expressed as a percentage of the control value. We used GraphPad Prism 9 software to calculate the IC₅₀.

4.6. Morphological Analysis of Eleutherine-Treated C6 Glioma Cells

Morphological alterations of C6 glioma cells were examined with a phase-contrast microscope (Leica DMI6000B). Cells were seeded in 12-well plate and incubated for 12 h with eleutherine at different concentrations (1 µM, 20 µM, 40 µM, 100 µM). Images were taken using a 63× objective.

4.7. Wound Healing/Scratch Migration Assay

A 12-well plate cell migration assay was performed to estimate the effect of eleutherine on C6 migration capacity. After 12 h of cell culture, a transverse lesion was made in the central surface of each well. Cells were treated with eleutherine at different concentrations (1 µM, 20 µM, 40 µM, and 100 µM). Cell migration to the injured area was followed by image capture using a digital camera coupled to an inverted microscope (Leica DMI6000B), using a 10× objective, at 0, 12, 24, and 48 h of treatment.

4.8. Colony Formation Assay

A colony formation assay was performed to evaluate the effect of eleutherine on cell proliferation. The C6 cells were used to seed a 12-well plate. After 24 h of culture, they were treated with eleutherine (1, 20, 40, and 100 µM) for 12 h. Cells were washed with PBS and dissociated with trypsin-EDTA (700 µL, 5 min). Quantification was made in a Neubauer chamber (1:1) in a 0.4% trypan blue solution. An aliquot of 1000 viable cells from each group was used to seed a 6-well plate and cultured for 7 days, with the medium changed every 2 days. Cultures were then washed with PBS and stained with 0.25% crystal violet/50% ethanol for 30 min.

4.9. Annexin V-FITC–Propidium Iodide (PI) Assay

Apoptosis/necrosis analysis was performed with the annexin V-FITC kit (Invitrogen). Cells were cultivated in a 12-well plate and treated with eleutherine (1, 20, and 40 µM) for 12 h. After that, cells were treated according to the manufacturer's protocol. In each sample, 1 µL of annexin V-FITC and 2.5 µL of PI (250 µg/mL) were added and incubated for 10 min in an ice bath protected from light. The volume was made up to 250 µL with binding buffer and analyzed using a flow cytometer (BD FACSCanto II). Camptothecin (Sigma-Aldrich) was used as positive control (5 µM). The samples were analyzed using the

flow cytometer with BD FACSDiva software, and a total of 10,000 events were collected for each sample and analyzed using the Flowing Software 2.5.1 (Turku, Finland). The final results were analyzed by cell percentage in each quadrant.

4.10. Western Blotting

The C6 cells were treated with eleutherine (1, 20, and 40 μM) for 12 h, after which cell lysates were prepared. Each lysate (60 μg of protein) was submitted to 10% SDS-PAGE gel electrophoresis. Gels were electrotransferred to nitrocellulose membranes (Hybond ECL, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) by use of a membrane transfer system (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% skim milk at room temperature for 1 h, followed by overnight incubation with primary antibodies anti-AKT (cat.no.9272, Cell Signaling Technology) and anti-phospho-AKT (Ser473) (cat.no.9271, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) in 1:1000 dilution, and anti-GAPDH (C terminus) (SAB2500450, Sigma-Aldrich), dilution 1:500. After washing, the membranes were incubated with the secondary antibodies goat anti-mouse IgG, peroxidase conjugated in 1:2500 dilution, and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody used at 1:2500 (NIF824, GE Healthcare) for 1 h. Protein expression was detected using a chemiluminescent substrate kit (Merck Millipore, Burlington, MA, USA), and the images were captured by a ChemiDoc system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.11. Real-Time Quantitative PCR Assay

Total RNA was extracted with TRI reagent (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's instructions. The RNA concentration and quality were determined using a NanoDrop spectrophotometer (Kisker Biotech, Steinfurt, Germany) and 1% agarose gels. Complementary DNA was synthesized using high-capacity cDNA archive (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). The TERT mRNA expression (Rn01409457_m1) was evaluated by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) with primers and TaqMan probes purchased as Assays-on-Demand Products for Gene Expression (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). The GAPDH gene (Rn01462662_g1) was selected as an internal control for RNA input and reverse transcription efficiency. All real-time qRT-PCR reactions were performed in triplicate for the hTERT and GAPDH genes. Data were previously analyzed with the $2^{-\Delta\text{Ct}}$ method and subsequently by relative quantification of the genes' expression, which was calculated according to Livak and Schmittgen (2001) and Arocho et al. (2006) [49,50].

4.12. Ethics Statement

This study was approved by the Committee of Ethics of Animal Experiments of the Federal University of Pará (CEUA/UFFPA 9381260919). We followed the guidelines found in the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the experiments were carried out in compliance with the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, Brazil).

4.13. Statistical Analysis

The data are expressed as the means \pm SEM. The ANOVA followed by Tukey's post hoc method using the statistical program GraphPad Prism 9. The significance levels are indicated as * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, and **** $p < 0.0001$.

5. Conclusions

In conclusion, our results suggest that eleutherine has cytotoxic and antiproliferative activity in glioma cells and induces their death by inhibiting the PI3K/AKT/telomerase pathway. This opens the important possibility that eleutherine is a viable cancer treatment, which should be further tested and studied in an in vivo model.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27248850/s1>, Figure S1: Spectrum of mass (70 eV) of eleutherine isolated from the bulbs of *Eleutherine plicata*; Figure S2: Spectrum of FT-IR (KBr) of eleutherine isolated from the bulbs of *Eleutherine plicata*; Figure S3: Eleutherine is nontoxic to nonneoplastic (glial) cells as analyzed by MTT assay.

Author Contributions: Conceptualization, J.L.M.d.N.; resources V.M.T.S., I.M.O.S., E.G.d.S., A.J.G.-P., D.P.F., D.D.M.S.B. and N.F.R.; writing—original draft preparation, V.M.T.S., I.M.O.S., I.M.F., R.S.P., R.M.R.B., B.M.M., E.O.S. and J.L.M.d.N.; writing—review and editing, C.B.C.S., E.O.S., B.M.M. and J.L.M.d.N.; visualization, E.O.S. and B.M.M.; supervision, B.M.M. and J.L.M.d.N.; project administration, J.L.M.d.N.; funding acquisition, J.L.M.d.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number 434501/2018-2), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA, grant number 063/2020), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PROPESP-UFPA).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Avicola S/G LTDA (Santa Izabel do Pará, Brazil) for kindly providing fertilized White Leghorn eggs (*Gallus gallus*) for our experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Schwartzbaum, J.; Fisher, J.L.; Aldape, K.D.; Wrensch, M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **2006**, *2*, 494–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Wen, P.Y.; Kesari, S. Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 492–507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Cloughesy, T.F.; Cavenee, W.K.; Mischel, P.S. Glioblastoma: From Molecular Pathology to Targeted Treatment. *Annu. Rev. Pathol.* **2014**, *9*, 1–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Chen, D.L.; Hu, M.G.; Liu, Y.Y.; Li, R.T.; Yu, M.; Xu, X.D.; Ma, G.X. New Naphthalene Derivatives from the Bulbs of *Eleutherine americana* with Their Protective Effect on the Injury of HUVECs. *Molecules* **2018**, *23*, 2111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chokshi, C.R.; Brakel, B.A.; Tatari, N.; Savage, N.; Salim, S.K.; Venugopal, C.; Singh, S.K. Advances in Immunotherapy for Adult Glioblastoma. *Cancers* **2021**, *13*, 3400. [[CrossRef](#)]
6. Behin, A.; Xuan-Hoang, K.; Carpentier, A.F.; Delattre, J.Y. Primary brain tumors in adults. *Lancet* **2003**, *361*, 323–331. [[CrossRef](#)]
7. Lapointe, S.; Perry, A.; Butowski, N.A. Primary brain tumors in adults. *Lancet* **2018**, *392*, 432–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ostrom, Q.T.; Patil, N.; Cioffi, G.; Waite, K.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013–2017. *Neuro Oncol.* **2020**, *22*, 1–96. [[CrossRef](#)]
9. Fernandes, C.; Costa, A.; Osório, L.; Lago, R.C.; Linhares, P.; Carvalho, B.; Caeiro, C. Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. *Codon Publ.* **2017**, *11*, 197–241.
10. Stupp, R.; Hegi, M.E.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Taphoorn, M.J.B.; Janzer, R.C.; Ludwin, S.K.; Allgeier, A.; Fisher, B.; Belanger, K.; et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* **2009**, *10*, 459–466. [[CrossRef](#)]
11. Oh, J.; Sahgal, A.; Sanghera, P.; Tsao, M.N.; Davey, P.; Lam, K.; Symons, S.; Aviv, R.; Perry, J.R. Glioblastoma: Patterns of Recurrence and Efficacy of Salvage Treatments. *Can. J. Neurol. Sci.* **2011**, *38*, 621–625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Jackson, C.; Choi, J.; Khalafallah, A.M.; Price, C.; Bettgowda, C.; Lim, M.; Gallia, G.; Weingart, J.; Brem, H.; Mukherjee, D. A systematic review and meta-analysis of supratotal versus gross total resection for glioblastoma. *J. Neurooncol.* **2020**, *148*, 419–431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Harmouch, E.; Seitlinger, J.; Chaddad, H.; Ubeaud-Sequier, G.; Barths, J.; Saidu, S.; Désaubry, L.; Grandemange, L.; Massfelder, T.; Fuhrmann, G.; et al. Flavagline synthetic derivative induces senescence in glioblastoma cancer cells without being toxic to healthy astrocytes. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 13750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Nair, M.; Bolyard, C.; Lee, T.J.; Kaur, B.; Yoo, J.Y. Therapeutic Application of Brain-Specific Angiogenesis Inhibitor 1 for Cancer Therapy. *Cancers* **2021**, *13*, 3562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Colquhoun, A. Cell biology-metabolic crosstalk in glioma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2017**, *89*, 171–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Nguyen, H.S.; Shabani, S.; Awad, A.J.; Kaushal, M.; Doan, N. Molecular Markers of Therapy-Resistant Glioblastoma and Potential Strategy to Combat Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1765. [[CrossRef](#)]

17. Barros, M.B.L.; Pinheiro, D.R.; Borges, B.N. Mitochondrial DNA Alterations in Glioblastoma (GBM). *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5855. [[CrossRef](#)]
18. Ferreira, W.A.S.; Amorim, C.K.N.; Burbano, R.R.; Villacis, R.A.R.; Marchi, F.A.; Medina, T.S.; de Lima, M.M.C.; de Oliveira, E.H.C. Genomic and transcriptomic characterization of the human glioblastoma cell line AHOL₁. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2021**, *54*, 9571. [[CrossRef](#)]
19. Mckinnon, C.; Nandhabalan, M.; Murray, S.A.; Plaha, P. Glioblastoma: Clinical presentation, diagnosis, and management. *BMJ* **2021**, *374*, 1560. [[CrossRef](#)]
20. Campos, A.; Vendramini-Costa, D.B.; Fiorito, G.F.; Ruiz, A.L.T.G.; Carvalho, J.E.; Souza, G.M.R.; Delle-Monache, F.; Cechinel-Filho, V. Antiproliferative effect of extracts and pyranonaphthoquinones obtained from *Cipura paludosa* bulbs. *Pharm. Biol.* **2016**, *54*, 1022–1026. [[CrossRef](#)]
21. Gomes, A.R.Q.; Galucio, N.C.R.; Albuquerque, K.C.O.; Brígido, H.P.C.; Varela, E.L.P.; Castro, A.L.G.; Vale, V.V.; Bahia, M.O.; Burbano, R.M.R.; Molfeta, F.A.; et al. Toxicity evaluation of *Eleutherine plicata* Herb. extracts and possible cell death mechanism. *Toxicol. Rep.* **2021**, *8*, 1480–1487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Mahabusarakam, W.; Hemtasin, C.; Chakthong, S.; Voravuthikunchai, S.P.; Olawumi, I.B. Naphthoquinones, Anthraquinones and Naphthalene Derivatives from the Bulbs of *Eleutherine americana*. *Planta Med.* **2010**, *76*, 345–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Chen, G.; Yue, Y.; Qin, J.; Xiao, X.; Ren, Q.; Xiao, B. Plumbagin suppresses the migration and invasion of glioma cells via downregulation of MMP-2/9 expression and inactivation of PI3K/Akt signaling pathway in vitro. *J. Pharmacol. Sci.* **2017**, *134*, 59–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Matias, D.; Balça-Silva, J.; Dubois, L.G.; Pontes, B.; Ferrer, V.P.; Rosário, L.; Anália, C.; Echevarria, J.L.; Ribeiro, A.B.S.; Lopes, M.C.; et al. Dual treatment with shikonin and temozolomide reduces glioblastoma tumor growth, migration and glial-to-mesenchymal transition. *Cell Oncol. (Dordr.)* **2017**, *40*, 247–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bernardo, P.S.; Guimarães, G.H.C.; De Faria, F.C.C.; Longo, G.M.C.; Lopes, G.P.F.; Netto, C.D.; Costa, P.R.R.; Maia, R.C. LQB-118 compound inhibits migration and induces cell death in glioblastoma cells. *Oncol. Rep.* **2020**, *43*, 346–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Krishnan, P.; Bastow, K.F. Novel Mechanisms of DNA Topoisomerase I—Inhibition by Pyranonaphthoquinone Derivatives *Eleutherin*, a *Lapachone*, and *B Lapachone*. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 1367–1379. [[CrossRef](#)]
27. Andoh, T.; Ishida, R. Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1400*, 155–171. [[CrossRef](#)]
28. Pereyra, C.E.; Dantas, R.F.; Ferreira, S.B.; Gomes, L.P.; Silva-Jr, F.P. The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. *Cancer Cell Int.* **2019**, *19*, 207. [[CrossRef](#)]
29. Aminin, D.; Polonik, S. 1,4-Naphthoquinones: Some Biological Properties and Application. *J. Pharm. Soc. Jpn.* **2020**, *68*, 46–57. [[CrossRef](#)]
30. Kumar, P.; Mallya, P.; Jain, V. Naphthoquinones in the Treatment of Cancer. *J. Pharm. Sci. Res.* **2020**, *12*, 587–590.
31. Tewierik, L.M.; Dimitriadis, C.; Donner, C.D.; Gill, M.; Willems, B. Total synthesis of enantiopure 1,3-dimethylpyranonaphthoquinones including ventiloquinones E, G, L and eleutherin. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3311–3318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Guo, N.; Miao, R.; Gao, X.; Huang, D.; Hu, Z.; Ji, N.; Nan, Y.; Jiang, F.; Gou, X. Shikonin inhibits proliferation and induces apoptosis in glioma cells via downregulation of CD147. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *19*, 4335–4343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ma, X.; Yu, M.; Hao, C.; Yang, W. Shikonin induces tumor apoptosis in glioma cells via endoplasmic reticulum stress, and Bax/Bak mediated mitochondrial outer membrane permeability. *J. Ethnopharmacol.* **2020**, *263*, 113059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Shi, M.; Cai, Q.; Yao, L.; Mao, Y.; Ming, Y.; Ouyang, G. Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells. *Cell Biol. Int.* **2006**, *30*, 221–226. [[CrossRef](#)]
35. Deleyrolle, L.P.; Reynolds, B.A. Identifying and enumerating neural stem cells: Application to aging and cancer. *Prog. Brain Res.* **2009**, *175*, 43–51.
36. Rajendran, V.; Jain, M.V. In Vitro Tumorigenic Assay: Colony Forming Assay for Cancer Stem Cells. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1692*, 89–95.
37. Zhang, F.Y.; Hu, Y.; Que, Z.Y.; Wang, P.; Liu, Y.H.; Wang, Z.H.; Xue, Y.X. Shikonin Inhibits the Migration and Invasion of Human Glioblastoma Cells by Targeting Phosphorylated β -Catenin and Phosphorylated PI3K/Akt: A Potential Mechanism for the Anti-Glioma Efficacy of a Traditional Chinese Herbal Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 23823–23848. [[CrossRef](#)]
38. Costa, D.C.; Rangel, L.P.R.; Martins-Dinis, M.M.D.C.; Ferreti, G.D.S.; Ferreira, V.F.; Silva, J.L. Anticancer Potential of Resveratrol, Lapachone and their analogues. *Molecules* **2020**, *25*, 893. [[CrossRef](#)]
39. Li, X.; Wu, C.; Chen, N.; Gu, H.; Yen, A.; Cao, L.; Wang, E.; Wang, L. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 33440–33450. [[CrossRef](#)]
40. Rhun, E.L.; Preusser, M.; Roth, P.; Reardon, D.A.; van den Bent, M.; Wen, P.; Reifenberger, G.; Weller, M. Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treat. Rev.* **2019**, *80*, 101896. [[CrossRef](#)]
41. Behrooz, A.B.; Talaie, Z.; Jusheghani, F.; Los, M.J.; Klönisch, T.; Ghavami, S. Wnt and PI3K/Akt/mTOR Survival Pathways as Therapeutic Targets in Glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Dratwa, M.; Wysoczanska, B.; Łacina, P.; Kubik, T.; Bogunia-Kubik, K. TERT-Regulation and Roles in Cancer Formation. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 589929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Aquilanti, E.; Kageler, L.; Wen, P.Y.; Meyerson, M. Telomerase as a therapeutic target in glioblastoma. *Neuro Oncol.* **2021**, *23*, 2004–2013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Jorge, P.M.; Oliveira, I.M.; Chiela, E.C.F.; Viau, C.M.; Saffi, J.; Horn, F.; Rosa, R.M.; Guecheva, T.N.; Henriques, J.A.P. Diphenyl Ditelluride-Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis: A Relation with Topoisomerase I Inhibition. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2015**, *116*, 273–280. [[CrossRef](#)]
45. Brazvan, B.; Ebrahimi, A.K.; Velaei, K.; Mehdipour, A.; Aliyari, Z.S.; Ebrahimi, A.; Ghorbani, M.; Cheraghi, O.; Charoudeh, H.N. Telomerase activity and telomere on stem progeny senescence. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *102*, 9–17. [[CrossRef](#)]
46. Dogan, F.; Avci, C.B. Correlation between Telomerase and mTOR pathway in Cancer Stem Cells. *Gene* **2018**, *641*, 235–239. [[CrossRef](#)]
47. Ghareghomi, S.; Ahmadian, S.; Zarghami, N.; Kahroba, H. Fundamental insights into the interaction between telomerase/TERT and intracellular signaling pathways. *Biochimie* **2021**, *181*, 12–24. [[CrossRef](#)]
48. Baliza, D.D.M.S.; Silva, J.F.M.S.; Ferreira, E.M.S.; Ferreira, I.M.; Silva, E.O.; Nascimento, J.L.M.; Pimenta, R.S. Screening of Endophytes for Anticancer Compounds. In *Endophytic Microbes: Isolation, Identification, and Bioactive Potentials*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2022.
49. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(−Delta Delta C(T))} method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]
50. Arocho, A.; Chen, B.; Ladanyi, M.; Pan, Q. Validation of the 2-DeltaDeltaCt calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts. *Diagn. Mol. Pathol.* **2006**, *15*, 56–61. [[CrossRef](#)]

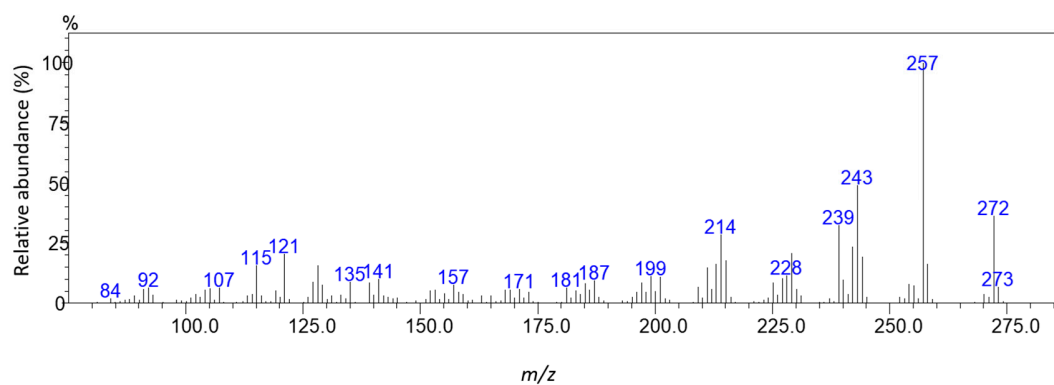


Figure S1. Spectrum of mass (70 eV) of eleutherine isolated from the bulbs of *Eleutherine plicata*.

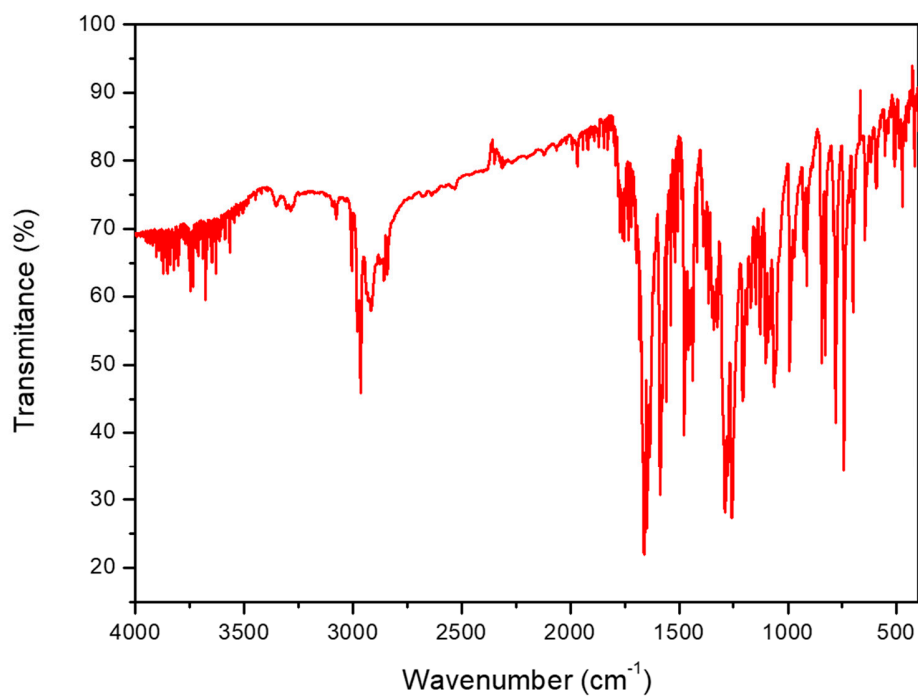


Figure S2. Spectrum of FT-IR (KBr) of eleutherine isolated from the bulbs of *Eleutherine plicata*.

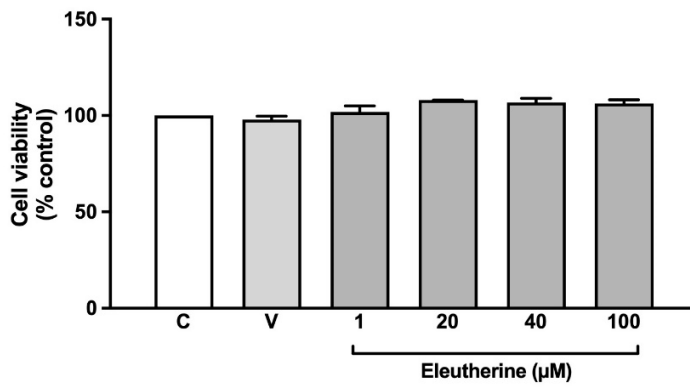


Figure S3: Eleutherine is nontoxic to nonneoplastic (glial) cells as analyzed by MTT assay. Cells were treated with different concentrations of eleutherine for 24 h. Data are presented as the mean \pm SEM of three independent trials (ANOVA, Tukey post test). C, control; V, vehicle.

ANEXO VI – Capítulo de livro “Screening of Endophytes for Anticancer Compounds. In Endophytic Microbes: Isolation, Identification, and Bioactive Potentials; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2022”.

Springer Protocols

A. Sankaranarayanan
Natarajan Amaresan
Mitesh Kumar Dwivedi *Editors*

Endophytic
Microbes: Isolation,
Identification,
and Bioactive
Potentials

 Springer

SPRINGER PROTOCOLS HANDBOOKS

For further volumes:
<http://www.springer.com/series/8623>

Springer Protocols Handbooks collects a diverse range of step-by-step laboratory methods and protocols from across the life and biomedical sciences. Each protocol is provided in the Springer Protocol format: readily-reproducible in a step-by-step fashion. Each protocol opens with an introductory overview, a list of the materials and reagents needed to complete the experiment, and is followed by a detailed procedure supported by a helpful notes section offering tips and tricks of the trade as well as troubleshooting advice. With a focus on large comprehensive protocol collections and an international authorship, *Springer Protocols Handbooks* are a valuable addition to the laboratory.

Endophytic Microbes: Isolation, Identification, and Bioactive Potentials

Edited by

A. Sankaranarayanan

*Department of Life Sciences, Sri Sathya Sai University for Human Excellence,
Navanihal, Kamalapur, Kalaburagi, Karnataka, India*

Natarajan Amaresan and Mitesh Kumar Dwivedi

C.G. Bhakta Institute of Biotechnology, Uka Tarsadia University, Surat, Gujarat, India

 **Humana Press**

Editors

A. Sankaranarayanan
Department of Life Sciences
Sri Sathya Sai University for Human Excellence
Navanihal, Kamalapura
Kalaburagi, Karnataka, India

Natarajan Amaresan
C.G. Bhakta Institute of Biotechnology
Uka Tarsadia University
Surat, Gujarat, India

Mitesh Kumar Dwivedi
C.G. Bhakta Institute of Biotechnology
Uka Tarsadia University
Surat, Gujarat, India

ISSN 1949-2448 ISSN 1949-2456 (electronic)
Springer Protocols Handbooks
ISBN 978-1-0716-2826-3 ISBN 978-1-0716-2827-0 (eBook)
<https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2827-0>

© The Editor(s) (if applicable) and The Author(s), under exclusive license to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

This work is subject to copyright. All rights are solely and exclusively licensed by the Publisher, whether the whole or part of the material is concerned, specifically the rights of translation, reprinting, reuse of illustrations, recitation, broadcasting, reproduction on microfilms or in any other physical way, and transmission or information storage and retrieval, electronic adaptation, computer software, or by similar or dissimilar methodology now known or hereafter developed.

The use of general descriptive names, registered names, trademarks, service marks, etc. in this publication does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

The publisher, the authors, and the editors are safe to assume that the advice and information in this book are believed to be true and accurate at the date of publication. Neither the publisher nor the authors or the editors give a warranty, expressed or implied, with respect to the material contained herein or for any errors or omissions that may have been made. The publisher remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

This Humana imprint is published by the registered company Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature.

The registered company address is: 1 New York Plaza, New York, NY 10004, U.S.A.



Screening of Endophytes for Anticancer Compounds

**Drielly Dayanne Monteiro dos Santos Baliza,
Juliana Fonseca Moreira da Silva, Eskálath Morganna Silva Ferreira,
Irlon M. Ferreira, Edilene Oliveira da Silva,
José Luiz Martins do Nascimento, and Raphael Sanzio Pimenta**

Abstract

Endophytes are microorganisms that colonize plant tissues and participate in the production of several compounds with biotechnological interest. Available treatments against cancer have inefficiencies, prompting studies on potential alternative sources to the synthesis of metabolites, such as those from fungi. Isolation and study of endophytes is an alternative method to extremely low amounts of active principles extracted from plants, deforestation and difficulty in re-isolation of active ingredients due to changes in environment, season, and geography. The evolution of different morphological, biochemical, and molecular techniques provides a vision capable of directing the biological activity of new secondary metabolites of endophytes, monitoring the progression of cell death under any conditions, demonstrating how these metabolites work.

Key words Endophytic, Bioactive compounds, Cancer cell lines, Cytotoxicity, In vitro techniques

1 Introduction

Endophytes are microorganisms that colonize internal tissues of plants (roots, stem, fruits, leaves, and seeds) without causing immediate negative effects, which can bring several benefits to the host plant, such as protection and growth promotion [1]. Within medicinal plants, they influence the formation of secondary metabolites, being reported the ability to produce distinctly aliphatic compounds, alkaloids, benzopyranones, chinones, phenolic acids, phytohormones, quinones, steroids, saponins, tannins, terpenoids, tetralones, xanthonones, and others compounds with biotechnological interest [2–6].

Among the current methods of cancer treatment, chemotherapy is the most effective for the treatment of metastatic tumors, but it has characteristics of multi-resistance of cancer cells and side

effects, triggering treatment inefficiency [7]. Hartwell [8] listed more than 3000 species of plants used in the treatment of cancer and there are several anticancer drugs with active ingredients of plant origin, but for the preparation of these drugs there are some difficulties such as extremely low amounts of active ingredients, severe deforestation and the difficulty in re-isolation of active ingredients due to changes in environment, season, and geography [9].

In some cases, the difficulty with isolation of bioactive compounds from plants has made the extraction of new chemical compounds from endophytic derivatives an important object of study in recent years [10]. Thus, several studies involving higher plants have shown the association between endophytes and active metabolites, as well as their potential for medicinal use [11]. These potential endophytic microorganisms are favorable alternative sources for the synthesis of mimetic metabolites of interest to the host and prevent the overexploitation of host plants [12, 13].

The evolution of different morphological, biochemical, and molecular techniques provides insight capable of targeting biological activity of novel secondary metabolites from endophytes monitoring the progression of cell death in any conditions. These techniques resulted in an enormous advantage in knowledge on the regulatory network it takes for the cell to die [14–19]. In addition, *in vitro* methods are important to show how these secondary metabolites work [20].

2 Materials

2.1 *Obtaining Active Fungal Colonies*

- Endophytic fungi in Castellani, glycerol, or other stock culture.
- Petri dishes with Potato Dextrose Agar (PDA).
- Inoculation loop.
- B.O.D. incubator.

2.2 *Obtaining Fungal Colonies in Liquid Medium*

- Petri plate (90 mm) with pure colonies of endophytic fungi.
- YM broth (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% glucose).
- Flask Erlenmeyer (250 mL).
- Plastic straw (4 mm in diameter).
- Toothpicks.
- Shaker incubator.

2.3 *Extraction of Metabolites from Endophytic Fungi*

- Extraction funnel.
- Fungus grown in YM broth.
- Dichloromethane P. A. ACS.

- Rotary evaporator.
- Small glass bottles.
- Exhaust fume hood.
- Flat bottom balloon.

2.4 Processing of Extracts and Verification of Metabolites

- Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS).
- Methanol/water solution (1:1).
- Hexane.
- Chloroform.
- Ethyl acetate.
- Magnesium sulfate anhydrous.
- Helium gas.

2.5 Cancer Cell Lines Culture, Reagent, and Equipment

- Cancer cell lines can be obtained from purchased from a cell bank.
- Appropriated culture media, sera, and reagents.
- Cell Culture Plates (multiwell plates).
- PEN STREP - Penicillin Streptomycin solution.
- CMF – Calcium medium free.
- TRYPSIN/EDTA solution.
- Wash bath.
- pH meter.
- Automatic pipettes.
- Centrifuge.
- Refrigerate and freeze ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Liquid Nitrogen (N_2) containers.
- Sterilizer.
- CO_2 incubator.
- Laminar flow.
- Inverted microscope.

2.6 Cytotoxicity Assays in Cancer Cell Lines

2.6.1 Trypan Blue Protocol

- Cancer cell lines.
- Pasteur pipette.
- PBS (Phosphate buffered saline).
- Trypan blue solution.
- Hemocytometer chamber.
- Optical microscope.

- 2.6.2 *MTT Colorimetric Assay*
- Cancer cell lines.
 - MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide).
 - Dimethyl sulfoxide (DMSO).
 - Isopropanol.
 - HCl.
 - Microplate Reader.
- 2.6.3 *LDH*
- Cancer cells lines.
 - 96 well flat-bottom plate.
 - Sodium Pyruvate.
 - NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen).
 - KPO_4 (Potassium phosphate buffer).
 - Microplate Reader.
- 2.6.4 *Alamar Blue*
- Cancer cell lines.
 - Alamar blue solution (10%).
 - Medium free-serum.
 - Excitation wavelength 530 nm.
 - Emission wavelength 590 nm.
 - Fluorimeter of microplates.
- 2.6.5 *Colony Formation Assay*
- Cancer cell lines.
 - Trypsin solution.
 - Dimethyl sulfoxide (DMSO).
 - Ethanol.
 - Crystal violet.
 - Optical Microscope.
- 2.6.6 *Electron Microscopic Analysis*
- Cancer cell lines.
 - PHEM buffer (MgCl_2 -5 mM; KCl -70 mM; EDTA -10 mM; HEPES -20 mM; PIPES -60 mM).
 - Glutaraldehyde.
 - Formaldehyde.
 - OsO_4 (Osmium tetroxide).
 - PBS (Phosphate saline buffer).
 - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Potassium ferrocyanide).
 - CaCl_2 (Calcium chloride).

- EponResin.
- Uranyl acetate.
- Lead citrate.
- Ultramicrotome.
- Nickel Grids 300 mesh.
- Fume hood.
- Transmission Electron Microscopy.

2.6.7 Colony Formation Assay

- Cancer cell lines.
- Trypsin solution.
- Dimethyl sulfoxide (DMSO).
- Ethanol.
- Crystal violet.
- Optical microscope.

2.6.8 Annexin V-FITC-propidium iodide (PI) Assay

- Cancer cell lines.
- Annexin VFITC Apoptosis KIT.
- Propidium Iodide (PI).
- Binding Buffer (50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12,5 mM CaCl₂, pH = 7.4).
- FACS Tubes.
- Flow Cytometer.

2.6.9 Analysis of Mitochondrial Transmembrane Potential ($\Delta\Psi_m$)

- Cancer cell lines.
- JC1 – fluorescent carbocyanine dye.
- 12, 24, or 96-well plates.
- Dimethyl sulfoxide (DMSO).
- PBS.
- Flow Cytometer.

2.6.10 Cell Cycle Analysis

- Cancer cell lines.
- Dimethyl sulfoxide (DMSO).
- PBS (Phosphate saline buffer).
- Ethanol.
- CO₂ Incubator.
- RNaseA.
- Propide Iodide.
- Flow Cytometer.

2.6.11 *Western Blotting*

- Cellular lysates.
- Electrophoresis SDS PAGE gel.
- Nitrocellulose membranes.
- Primary and secondary antibody.
- Nonfat milk.
- Semidry transfer system.
- Chemiluminescent substrate Kit.
- Images captured by chemiDoc system.

2.6.12 *Caspase-3 Activity*

- Cell-culture 96-well, flat-bottom microplate.
- CHAPS buffer.
- Chromogenic substrates acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide (Ac-DEVD-pNA).
- p-nitroaniline (pNA).
- Phosphate buffer.
- Tris-HCl.
- Microplate reader.

3 Methods

3.1 *Obtaining Active Fungal Colonies*

- With the aid of a sterile microbiological loop, remove one or two disks (1 cm diameter) of the fungus (depending on the size of the colony grown), stored in Castellani, glycerol, or other storage methods.
- Insert the disk in the center of the plate containing previously sterilized solid culture medium (Potato Dextrose Agar) and incubate at 25 °C in B.O.D. for 5 days, or until pattern growth of the inserted colony is observed, as shown in Fig. 1.

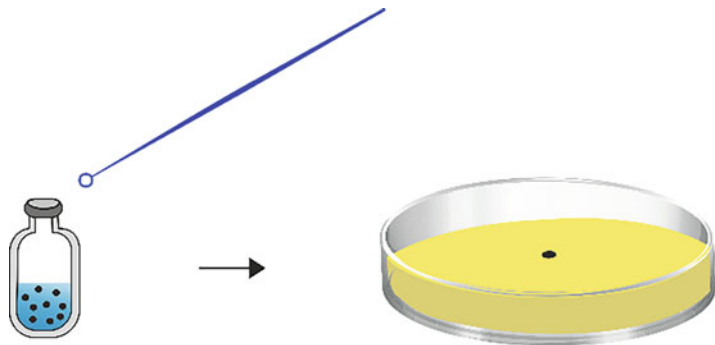


Fig. 1 Obtaining a fungal colony from stored endophytes

3.2 Obtaining Fungal Colonies in Liquid Medium

- With the plates with the purified fungi, remove five disks with the aid of a straw and toothpick, previously sterilized, and transfer them to an Erlenmeyer containing 200 mL of previously autoclaved YM broth, as shown in Fig. 2.
- Incubate at 25 °C in Shaker, at a rotation of 120 rpm, for 14 days.

3.3 Extraction of Metabolites from Endophytic Fungi

- Pour the YM broth with the fungal growth into the extraction funnel and top up with 1:1 dichloromethane. Shake to homogenize.
- Allow to decant until the water/dichloromethane separation, as shown in Fig. 3.

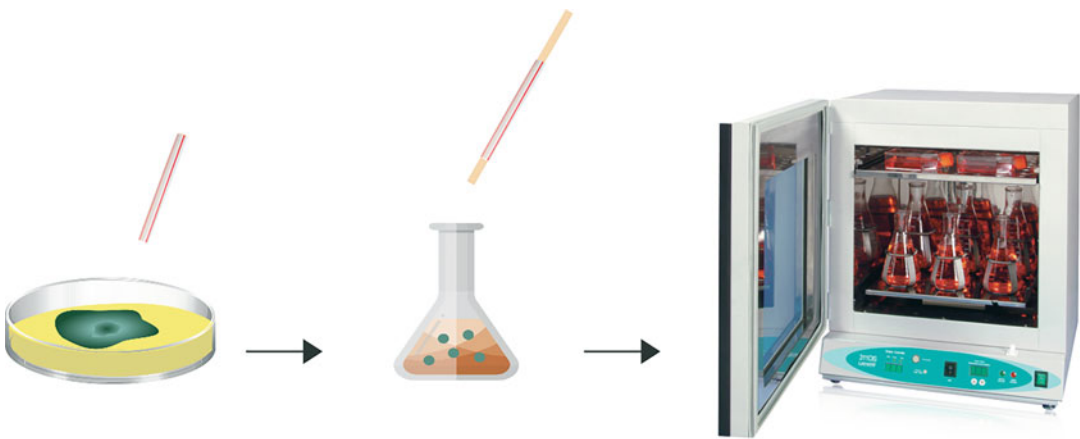


Fig. 2 Obtaining fungal colonies in liquid medium

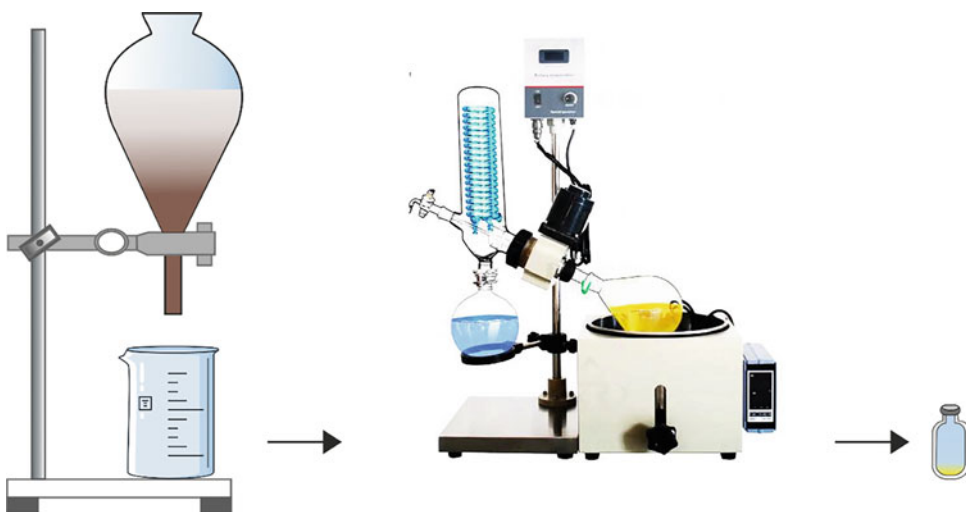


Fig. 3 Scheme for extracting metabolites from endophytic fungi

3.4 Processing of Extracts and Verification of Metabolites

- Remove the fraction of dichloromethane, which is at the bottom of the bottle, and put it to rotaevaporate.
- The rotating process evaporates the solvent, concentrating only the extract in the flask. Wash the flask with dichloromethane to loosen the evaporated and distribute in smaller flasks.
- Place the flasks to evaporate again in the exhaust hood.
- Resuspend approximately 2.7 g of the lyophilized material in 50 mL of a methanol/water (1:1) solution and then submit to a liquid/liquid partition (2×50 mL) using the solvents hexane, chloroform, and ethyl acetate, respectively.
- In each fraction add anhydrous magnesium sulfate and filter again.
- Rotaevaporate excess solvent at reduced pressure and analyze by Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS): Shimadzu/CGMS-PQ2010SE apparatus, coupled to Shimadzu/AOC-5000 autoinjector and a mass detector (Shimadzu MS2010 Plus) with electron impact (70 eV) equipped with a 30 m long RTX-5MS fused silica column, 0.25 mm outside diameter and 0.25 μm inside diameter, as shown in Fig. 4, using helium as a carrier gas, supporting a flow 1.03 mL/min.
- Soluble the sample in 2 μL of hexane and 1 μL must be subjected to experimental conditions, for example, as follows:
 - Injector temperature at 210 °C.
 - Detector temperature at 250 °C.
 - Helium gas as a drag in a flow of 3 mL/min.

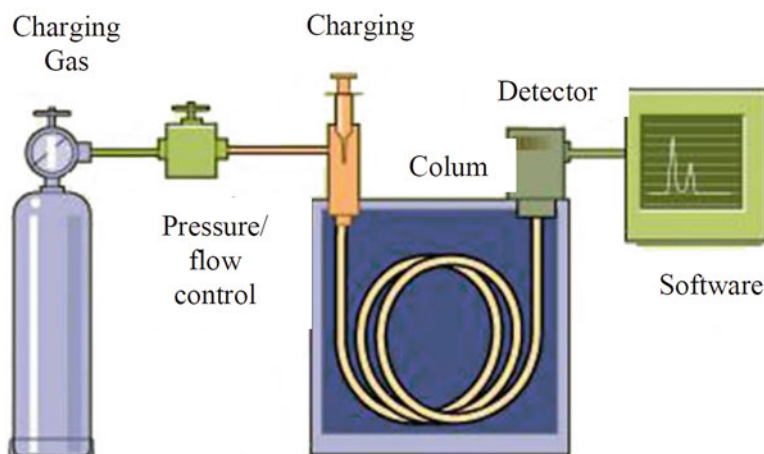


Fig. 4 Scheme of Gas Chromatograph coupled to Mass Spectrometer (GC-MS)

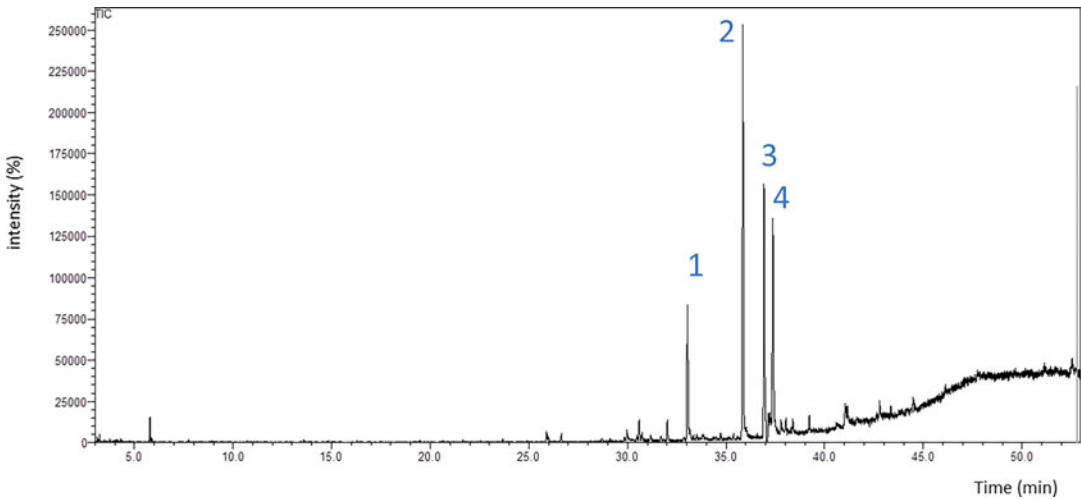


Fig. 5 Example of chromatogram of the hexane fraction from the ethanol extract of the roots of an Amazonian medicinal plant

- Injection divided in the proportion of 1/15.
- Set the column temperature from 90 °C, with an increase of 6 °C/min to 250 °C, ending with 5 min isothermal at this temperature.
- The substances identified in the fraction will show predominance peaks, as shown in Fig. 5.

3.5 Anticancer Analysis of Bioactive Compounds from Endophytes

3.5.1 Cancer Cell Lines

- Maintain cancer cell line at 37 °C, 5% CO₂ in 95% relative humidity in multiwell plates.
- Use media and sera appropriated for cancer cell line growth.
- View the cultures under a phase contrast inverted microscope.
- Remove small aliquots of the cells for determination of cell numbers.
- Add the appropriate cell density for each experiment.
- Change the medium every third day for 14 days to obtain well-differentiated monolayers of cancer cell line.

3.5.2 Perform Bioactive Compounds Treatment

- Remove the existing culture medium from the cells and replace with new medium.
- Incubate cancer cell line culture with different concentrations of bioactive compounds.
- Untreated cells as control.
- Discard media from cell cultures after treatment with bioactive compounds.

- Incubate cancer cell line cultures in the presence of bioactive compounds for 6, 12, 24, 48, and 72 h.
- At the end of the incubation period, determine the cell number by cytotoxicity methods and methods to detect apoptotic cell death.

3.5.3 Trypan Blue Assay Protocol

- Determine the cell density using a hemocytometer.
- Prepare a 0.4% solution of trypan blue in buffered isotonic salt solution, pH 7.4 phosphate-buffered saline.
- Add 0.1 mL of trypan blue stock solution to 0.1 mL of cells.
- Load a hemocytometer and examine immediately under a microscope at low magnification.
- Count the number of blue staining cells and the number of total cells. Cell viability should be at least 95% for healthy log-phase culture.
- Take images with an optical microscope.

3.5.4 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) Assay

- 10^6 cancer cells line in culture.
- Remove the existing culture medium from the cells and replace with new medium.
- Incubate the cells according to the standard treatment protocol.
- Discard media from cell cultures after treatment with bioactive compounds.
- Add 100 μ L of serum-free media and 20 μ L of MTT solution (5 mg/mL) into each well.
- Incubate for 2 h at room temperature in the dark until purple precipitate.
- Add 20 μ L DMSO or acid-isopropanol (100 μ L 0,04 N HCl in Isopropanolol) to dissolve the purple crystals.
- Measure the absorbance at 570 nm using a microplate reader.

3.5.5 LDH Assay

- 10^6 cancer cell lines in culture.
- Remove the existing culture medium from the cells and replace with new medium.
- Incubate the cells according to the standard treatment protocol.
- Discard media from cell cultures after treatment with bioactive compounds.
- Add 200 μ L of serum-free media.
- 2,3 μ Mol of sodium pyruvate.
- 0,2 mg NADH in 0,1 M KPO_4 into each well pH 7,0.

- Recorded automatically at 2 s interval.
- Measure absorbance at 340 nm using a microplate reader.
- Enzyme activity expressed in (LDH U/mL).

3.5.6 Alamar Blue Assay Method

- 10^6 cancer cell in culture.
- Remove the existing culture medium from the cells and replace with new medium.
- Incubate the cells according to the standard treatment protocol.
- Discard media from cell cultures after treatment with bioactive compounds.
- Dilute Alamar blue stock solution to 1:1 with serum-free medium.
- Volume of 50 μ L/well.
- Final assay volume of 250 μ L.
- Final concentration of 10% alamar blue.
- Read fluorescence at excitation 530 nm, emission at 590 nm.

3.5.7 Colony Formation Assay

- 2.5×10^5 cancer cell in culture.
- Remove the existing culture medium from the cells and replace with new medium.
- Incubate the cells according to the standard treatment protocol.
- Trypsinize cells and plate 1×10^3 of viable cells.
- After 14 days, stain at least 50% of the cells during 30 min with 0.25% crystal violet.
- Take images with phase contrast microscope.

3.5.8 Annexin V-FITC-Propidium Iodide (PI) Assay

- 100 μ L of cell suspension containing 10^4 cells culture.
- Remove the existing culture medium from the cells and replace with new medium.
- Incubate the cells according to the standard treatment protocol.
- Add 5 μ L of Annexin V-FITC.
- Add 5 μ L of PI.
- 15 min at room temperature in the darkness.
- 400 μ L of binding buffer.
- Annexin V-FITC.
- Measure 100,000 events using the green channel FL1 for Annexin V-FITC and red channel FL3 for PI.
- Analyze by Flow Cytometer.

3.5.9 *Analysis of Mitochondrial Transmembrane Potential ($\Delta\Psi_m$)*

- Seed 10^4 or 10^5 cells/mL in 12, 24 or 96-well plates.
- Washing with cold PBS.
- Incubate the cells according to the standard treatment protocol.
- After incubation, centrifuge cells for 3–4 min at $400\times g$ at $4^\circ C$ and aspirate the supernatant.
- Add 500 μ L PBS to suspend cells.
- Add 20 μ M JC-1 (250 μ L) for 15 min at room temperature.
- Measure a total of 100,000 events with the capture emissions set to 590 nm (red) and 530 nm (green).
- Analysis by Flow Cytometer.

3.5.10 *Transmission Electron Microscopy (TEM) Analysis*

- Seed line cells (2×10^6) in 75 cm^2 flasks.
- Incubate cells with different concentration of the bioactive compounds.
- After 24 h, wash cells with PBS and fix them with 1% glutaraldehyde, 4% freshly prepared formaldehyde, and 2.5% sucrose in 0,1 M PHEM buffer, at pH 7.2.
- Postfix in a 1% osmium tetroxide, 0.8% ferrocyanide potassium, and 5 mM calcium chloride solution for 1 h.
- Wash cells with 0.1 PHEM buffer.
- Dehydrate cells in graded acetone solutions (50, 70, 90, and two changes in 100% for 10 min).
- After dehydration, embed cells in Epon[®] resin.
- Cut thin sections on a ultramicrotome.
- Stain ultrathin sections with a saturated solution of uranyl acetate and lead citrate.
- Examine samples at 80 kV accelerating Voltage on a TEM.

3.5.11 *Cell Cycle Analysis*

- 1.5×10^5 cancer cells in culture.
- Remove the existing culture medium from the cells and replace with new medium.
- Incubate the cells according to the standard treatment protocol.
- Fix cells in 5 mL of cold 70% ethanol and stored at $4^\circ C$ for subsequent cell cycle analysis.
- Wash cells with PBS twice, incubate with 50 μ L of RNase A/PBS (100 μ g/mL) at $37^\circ C$ for 30 min and stain with 200 μ L of PI (50 μ g/mL) at room temperature in the dark for 15 min.
- Analysis by Flow cytometer.

3.5.12 Western Blotting

- Remove the existing culture medium from the cells and replace with new medium.
- Incubate cancer cell line with control or different concentration of bioactive compounds.
- After the induction of apoptosis, scrape cells and collect in 15 mL tube.
- Spin at 250 g for 10 min at 4 °C.
- Resuspend pellet in 6 mL 1× PBS and spin again at 250 g for 10 min at 4 °C to wash.
- Remove as much PBS as possible without disrupting pellet and then add 100 µL lysis buffer with appropriate protease inhibitor.
- Vortex and keep on ice for 20 min vortexing periodically.
- Spin at 1100 g for 15 min at 4 °C and collect supernatant.
- Keep lysates at –40 °C until further use.
- Cell lysates (30 µg/sample) were subjected to electrophoresis on a 10% SDS-PAGE gel.
- Electrotransfer gels onto nitrocellulose membranes.
- Semidry transfer system.
- Block the membranes with 5% nonfat milk at room temperature for 1 h.
- Incubate with primary antibody used at different dilution at 4 °C overnight and after use a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody at 1:5000 for 1 h.
- Detect immunoblotting using a chemiluminescent substrate kit.
- Capture the images by a ChemiDoc system.

3.5.13 Caspase Activity Assay

- After the induction of apoptosis with bioactive compounds or control, scrape cells and collect in 15 mL tube.
- Spin at 250 g for 10 min at 4 °C.
- Resuspend pellet in 6 mL 1× PBS and spin again at 250 g for 10 min at 4 °C.
- Homogenized in Buffer containing 25 mM Hepes, 5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 2 mM DTT and 0.1% CHAPS (pH 7.5).
- Centrifuges at 12,000 × g for 10 min (4 °C).
- Total protein (100 µg) from the supernatants.
- Determine activities of caspase-3 using the chromogenic substrates, namely 200 µM Ac-DEVD-pNA, PH 7.5.
- Absorbance at 405 nm determined in a microplate reader after incubation at 37 °C for 1 h.
- Specific activities of caspase-3 (nmol of pNA formed/min/mg) calculated using standard curve of *p*-nitroaniline (*p*NA), using 100 µL volume in a 96-well plate using an ELISA reader.

References

- Jia M, Chen L, Xin HL, Zheng CJ, Rahman K, Han T, Qin LPA (2016) Friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants. *Front Microbiol* 7:907
- Saikkonen K, Wäli P, Helander M, Faeth SH (2004) Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends Plant Sci* 9(6):275–280
- Tan RX, Zou WX (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep* 18(4):448–459
- Strobel G, Daisy B (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(4):491–502
- Gouda S, Das G, Sen SK, Shin HS, Patra JK (2016) Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Front Microbiol* 29(7):1538
- El-Hawary SS, Sayed AM, Rateb ME, Baker W, AbouZid SF, Mohammed R (2017) Secondary metabolites from fungal endophytes of *Solanum nigrum*. *Nat Prod Res* 31(21):2568–2571
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2(1):48–58
- Hartwell JL (1982) Plants used against cancer: a survey. Quarterman, Lawrence
- Kharwar RN, Mishra A, Gond SK, Stierle A, Stierle D (2011) Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Nat Prod Rep* 28(7):1208–1228
- Li SJ, Zhang X, Wang XH, Zhao CQ (2018) Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity. *Eur J Med Chem* 5(156):316–343
- Chandra H, Kumari P, Prasad R, Gupta SC, Yadav S (2021) Antioxidant and antimicrobial activity displayed by a fungal endophyte *Alternaria alternata* isolated from *Picrorhizakurroa* from Garhwal Himalayas, India. *Biocatal Agric Biotechnol* 33:101955
- Verma VC, Kharwar RN, Strobel GA (2009) Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. *Nat Prod Commun* 4(11):1511–1532
- Su LJ, Mahabir S, Ellison GL, McGuinn LA, Reid BC (2012) Epigenetic contributions to the relationship between cancer and dietary intake of nutrients, bioactive food components, and environmental toxicants. *Front Genet* 9(2):91
- Gao H, Li G, Lou HX (2018) Structural diversity and biological activities of novel secondary metabolites from endophytes. *Molecules* 23: 646–677
- Fox R, Aubert M (2008) Flow cytometric detection of activated Caspase-3. In: Mor G, Alvero AB (eds) *Methods in molecular biology, apoptosis and cancer: methods and protocols*. Humana Press Inc, Totowa, pp 47–56
- Koopman G, Reutelingsperger COM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, van Oers MHJ (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84:1415–1442
- Maues LAL, Alves GM, Couto NMG, da Silva BJM, Arruda MSP, Macchi BM, Senac CBC, Pradoc AF, Crespo-Lopez ME, Silva EO, do Nascimento JLM (2019) Flavonoids from the Amazon plant *Brosimumacutifolium* induce C6 glioma cell line apoptosis by disrupting mitochondrial membrane potential and reducing AKT phosphorylation. *Biomed Pharmacother* 13:1.08728
- McCarthy N, Evan G (1998) Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Curr Top Dev Biol* 36:258–278
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63
- Obeng E (2021) Apoptosis (programmed cell death) and its signals – a review. *Braz. J Biol* 81: 1133–1143